

PCT/JP 2004/011480

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

13.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年12月 8日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-409639  
[ST. 10/C]: [JP 2003-409639]

出 願 人  
Applicant(s): タカラバイオ株式会社

REC'D 07 OCT 2004

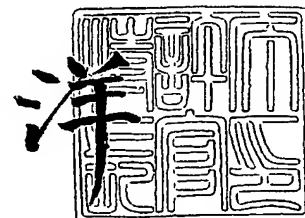
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3085932

【書類名】 特許願  
【整理番号】 T-1866  
【提出日】 平成15年12月 8日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
C12N 9/22

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内  
【氏名】 佐川 裕章

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内  
【氏名】 友野 潤

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内  
【氏名】 上野 はるみ

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内  
【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】  
【識別番号】 302019245  
【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社  
【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 173212  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

dsRNA 分解活性を有するタンパク質であって、dsRNA に作用して特定の長さの dsRNA を生成する活性を有することを特徴とする dsRNA 分解活性を有するタンパク質。

**【請求項 2】**

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、Dicer の機能ドメインを有することを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質。

**【請求項 3】**

Dicer の機能ドメインが、RNase IIIa、b ならびに dsRNA 結合ドメインからなることを特徴とする請求項 2 記載のタンパク質。

**【請求項 4】**

さらに PAZ ドメインを含むことを特徴とする請求項 3 記載のタンパク質。

**【請求項 5】**

特定の長さの dsRNA が、約 15～30 塩基対の dsRNA であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

**【請求項 6】**

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号 4 又は 17 記載のアミノ酸配列、あるいは配列表の配列番号 3 又は 16 記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

**【請求項 7】**

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号 4 又は 17 記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

**【請求項 8】**

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 分解活性を有するタンパク質を製造する方法であって、コドンに宿主での発現に適したものに変換するか、あるいはレアコドンに対する補強がなされた宿主を使用することを特徴とする dsRNA 分解活性を有するタンパク質の製造方法。

**【請求項 9】**

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 分解活性を有するタンパク質の製造方法であって、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることを特徴とする dsRNA 分解活性を有するタンパク質の製造方法。

**【請求項 10】**

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有するキット。

**【請求項 11】**

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で dsRNA に dsRNA 分解活性を有するタンパク質を作用させ、特定の長さの dsRNA を生成することを特徴とする dsRNA の分解方法。

**【請求項 12】**

核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質が融合タンパク質であることを特徴とする請求項 11 記載の方法。

**【請求項 13】**

核酸結合活性を有するタンパク質が、RNA 結合活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 11 又は 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

RNA 結合活性を有するタンパク質がコールド ショック プロテインであることを特徴

とする請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴とする請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

コールド ショック プロテインがサーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B であることを特徴とする請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

特定の長さの dsRNA が、約 15 ～ 30 塩基対の dsRNA であることを特徴とする請求項 11 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質であることを特徴とする請求項 11 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、天然型 Dicer あるいはその機能的同等物であることを特徴とする請求項 11 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で RNA 合成活性を有するタンパク質を用いて RNA 合成反応を行うことを特徴とする RNA の合成方法。

【請求項 21】

核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を用いることを特徴とする請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

核酸結合活性を有するタンパク質が、コールド ショック プロテインであることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載の方法。

【請求項 23】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴とする請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

コールド ショック プロテインが、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B であることを特徴とする請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

RNA 合成活性を有するタンパク質が、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 20 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

請求項 11 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びに dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 27】

請求項 11 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキット。

【請求項 28】

請求項 20 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 29】

請求項 20 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキット。



## 【書類名】明細書

【発明の名称】dsRNA分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質を用いたdsRNA分解方法ならびにRNA合成方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、特定の長さのdsRNAを生成する活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質、当該タンパク質と核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質を組み合わせたdsRNAの効率的な分解方法並びに核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を組み合わせたRNAの効率的な合成方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

最近、低分子dsRNAを利用する遺伝子工学的手法が報告されている。

例えば、RNA干渉(RNAi:RNA interference)は、dsRNAによってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子発現が抑制される現象である。dsRNAによって遺伝子サイレンシングができることがわかった発端は、線虫におけるアンチセンスを用いた研究からであった。1995年、GuoとKempnesはpar-1と呼ばれる遺伝子をアンチセンスRNAで抑制する実験を行なった。アンチセンスRNAを加えると、予想通りpar-1の発現を抑制したが、驚いたことに、コントロールとして用いたセンスRNAも同様にpar-1の発現を抑制し、par-1変異株の表現形を示した。(例えば、非特許文献1)

この矛盾は、1998年にFireらによって解き明かされた。アンチセンスRNAとセンスRNAを、それぞれRNAポリメラーゼを用いて合成するとき、わずかに非特異的に逆向きのRNAができてしまう。そのコンタミネーションによってできるdsRNAが遺伝子サイレンシングの本体であり、アンチセンスRNAおよびセンスRNAは遺伝子の発現を抑制できないこと、またアンチセンスRNAとセンスRNAをアニールさせたdsRNAが効率よく遺伝子の発現を抑制できることが明らかとなった。(例えば、非特許文献2)

## 【0003】

上記RNA干渉においては、Dicerと呼ばれる酵素がdsRNAから小分子のRNA(siRNA:short interfering RNA)を生成させる。(例えば、非特許文献3)

この酵素の作用により生じたsiRNAは、RISC(RNA induced silencing complex)と呼ばれる複合体に取り込まれ、該複合体が標的mRNAを認識し、分解すると考えられている。しかしながら、RNA干渉に関与すると考えられる各因子についての正確な機能についてはまだまだ未知の部分が多いのが現状であった。(例えば、非特許文献4)

## 【0004】

上記RNA干渉を効率よく行うためには、dsRNAならびにsiRNAを効率よく生成させることが重要である。上記Dicerとしてはヒト由来Dicer(例えば、非特許文献5)が例示され、さらにリコンビナントDicer(例えば、非特許文献6)がジーンセラピーシステムズ社あるいはストラタジーン社より販売されている。

しかしながら、上記のようリコンビナントDicerについては、本来の酵素学的な性能を十分に発揮しているかどうかについては詳細に検討されていない。また、上記Dicerの少なくともどのドメインを含有すれば、dsRNAに作用させて好適なdsRNA(siRNA)を生成させる活性を保持することができるか、さらにその遺伝子工学的な生産性を向上できるかについては知られていない。

さらに、dsRNAを効率よく生成させる方法についても特に有効な方法は知られていないのが現状であった。

## 【0005】

さらに、RNAポリメラーゼを用いて合成した約21ヌクレオチドの鎖長のdsRNAをそのままsiRNAとして利用する方法も報告されている（例えば、非特許文献7）。従って、RNAが効率よくできる方法があれば上記方法にも利用できる。

【0006】

【非特許文献1】Guo S. 他1名 Cell 1995年 vol. 81、p 611-620

【非特許文献2】Fire A. 他5名 Nature 1998年 vol. 39、p 806-811

【非特許文献3】Bernstein E. 他3名 Nature 2001年 vol. 409、p 363-366

【非特許文献4】Tabara H. 他3名 Cell 2002年 vol. 109、p 861-871

【非特許文献5】Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p 5875-5885

【非特許文献6】Myers J. W. 他3名 Nature biotechnology 2003年 vol. 21、p 324-328

【非特許文献7】Donze O. 他1名 Nucleic Acids Research 2002年 vol. 30, No. 10, e46

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質の提供、RNA干渉等に利用可能な特定の長さのdsRNAを効率よく生成させる方法並びにRNA合成の促進方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、Dicerの機能ドメインを解析し、長鎖のdsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質を見出した。また、核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質の共存下でdsRNAにdsRNA分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さのdsRNAを効率よく調製できること、さらに当該核酸結合活性を有するタンパク質がdsRNA合成に代表されるRNA合成反応においてもその効率を向上させることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明の第1の発明は、dsRNA分解活性を有するタンパク質であって、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成する活性を有することを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質に関する。

本発明の第1の発明において、dsRNA分解活性を有するタンパク質は、Dicerの機能ドメインを有することが好ましく、例えば、RNase IIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるものが好ましい。さらに、PAZドメインを含んでも良い。また、本発明の第1の発明のタンパク質を用いることにより、特定の長さのdsRNAが約15～30塩基対のdsRNAを生成させることができる。また本発明の第1の発明のタンパク質としては、dsRNA分解活性を有するタンパク質が配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質が例示される。あるいは、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、本発明の第1の発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、コドンで宿主での発現に適したものに交換することによって、あるいはレアコドンに対する補強がなされた宿主を使用する

ことによって効率よく製造することができる。

また、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることができる。さらに本発明の第1の発明のタンパク質は、コンポーネントとしてキットに含有させることができる。

#### 【0010】

本発明の第2の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で dsRNA に dsRNA 分解活性を有するタンパク質を作用させ、特定の長さの dsRNA を生成することとを特徴とする dsRNA の分解方法に関する。

本発明の第2の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、核酸結合活性を有するタンパク質は、RNA 結合活性を有するタンパク質であっても良い。当該 RNA 結合活性を有するタンパク質は、コールド ショック プロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B が例示される。

本発明の第2の発明の方法により、特定の長さの dsRNA が、約 15～30 塩基対の dsRNA を生成することができる。さらに、本発明の第2の発明において、dsRNA 分解活性を有するタンパク質は、本発明の第1の発明のタンパク質であっても良いし、天然型 Dicer あるいはその機能的同等物であっても良い。

#### 【0011】

本発明の第3の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で RNA 合成活性を有するタンパク質を用いて RNA 合成反応を行うことを特徴とする RNA の合成方法に関する。

本発明の第3の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、当該核酸結合活性を有するタンパク質は、コールド ショック プロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B が例示される。さらに、RNA 合成活性を有するタンパク質は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼであってもよい。

#### 【0012】

本発明の第4の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びに dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

#### 【0013】

本発明の第5の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

#### 【0014】

本発明の第6の発明は、本発明の第3の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

#### 【0015】

本発明の第7の発明は、本発明の第3の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

#### 【発明の効果】

#### 【0016】

本発明により、特定の長さの dsRNA を調製できる dsRNA 分解活性を有するタンパク質が提供される。さらに本発明により、RNA 干渉等に利用できる特定の長さの dsRNA を効率よく生成させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

## 【0017】

本明細書においてDicerとは、RNAiの初期段階で長鎖のdsRNAをsiRNAにプロセッシングできる機能を有するタンパク質のことを言う。天然型のDicerとしては、とくに限定はされないが例えばN末端側よりATP結合ドメイン、RNAヘリカーゼドメイン、機能未知なPAZドメイン、RNaseIIIa及びbドメイン、さらにdsRNA結合ドメインから構成されているものが挙げられる。

## 【0018】

本明細書において、Dicerの機能ドメインとは、長鎖dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成できる活性に関与する領域をコードする部位のことを言う。

## 【0019】

上記機能ドメインとしては、特に限定はされないが例えば、RNaseIIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインからなるものが例示される。当該RNaseIIIa、bドメインは、Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p5875-5885に記載のように、2本鎖RNAに特異的に作用し、5'末端にリン酸基をもつ特定の鎖長のオリゴヌクレオチドを生成させる活性に関与する領域をコードする部位であっても良い。さらに、dsRNA結合ドメインは、2本鎖RNAに特異的に結合する活性をコードする部位であっても良い。

## 【0020】

本明細書においてdsRNAとは、RNA干渉の対象となるmRNAと該mRNAに相補的な塩基配列を有するRNAとの2本鎖構造を形成したRNAのことを言う。

また、本明細書においてdsRNAの分解反応による生成物の応用例としては、主に以下に示すsiRNAがある。

## 【0021】

本明細書において特定の長さのdsRNAとは、特に限定はされないが例えば、約10～100塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAのことを言う。さらに、約15～30塩基対の範囲中の特定の長さ、特に20～25塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAであっても良い。これらのdsRNAは、siRNAとして使用できる。

## 【0022】

本明細書において核酸結合活性を有するタンパク質とは、一本鎖または二本鎖のDNA、RNAに結合する活性を有するタンパク質のことを言う。当該タンパク質としては、核酸の二次構造を解消する機能を有するものが好ましく、例えば、DNAヘリカーゼ、RNAヘリカーゼあるいはその機能的同等物が挙げられる。

## 【0023】

本明細書において低温誘導性ベクターとは、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターのことを言い、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

## 【0024】

本明細書においてコールド ショック プロテインとは、本来の生育条件よりも低温になるような状況下でその温度低下により刺激されて発現されるタンパク質の総称を言う。

## 【0025】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質、該タンパク質の製造方法ならびに該タンパク質を含有するキット

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成することができる。当該dsRNA分解活性を有するタンパク質としては、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば特に限定はなく、例えば、Dicerの機能ドメインを有するタンパク質が例示される。当該Dicerの機能ドメインは、RNaseIIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質であっても良い。また、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば、そのタンパク質の由来は問わない。

当該 RNase IIIa、b ドメイン並びに dsRNA 結合ドメインは、特に限定はされないが例えばヒト由来 Dicer の場合、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列の N 末端側のアミノ酸 1271～1924（配列表の配列番号 2 記載の塩基配列番号 3811～5772）を有するものが挙げられる。例えば、配列表の配列番号 4 記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号 3 記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer 変異体）あるいは配列表の配列番号 12 記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号 13 記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer 変異体）が例示される。

#### 【0026】

さらに本発明のタンパク質においては、PAZ ドメインを含有していても良く、特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号 17 記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号 16 記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer 変異体）あるいは配列表の配列番号 18 記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号 19 記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer 変異体）が例示される。

また、本発明において RNase III ドメインにさらに PAZ ドメインを含むことにより当該タンパク質は、酵素としての安定性を高めることできる。特に限定はされないが、例えば凍結融解における安定性等が挙げられる。

#### 【0027】

本発明のタンパク質は、特に限定はされないが例えば、長鎖 dsRNA を分解し、RNA 干渉に有効な siRNA を生成させることができる。

また、上記機能を有する範囲であれば上記アミノ酸配列あるいは塩基配列において、一ないしは複数個のアミノ酸あるいは塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加されたものも本発明の dsRNA 分解活性を有するタンパク質に含まれる。

特に限定はされないが、本発明の dsRNA 分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列（例えば、Perfect DB 配列等）、発現タンパク質精製のタグ配列（例えば、His tag 配列等）、あるいは発現タンパク質の N 末端側の付加配列を除去するための配列（例えば、Factor Xa 配列等）などのアミノ酸配列を付加したものも本発明の dsRNA 分解活性を有するタンパク質に含まれる。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号 12 又は 18 記載のアミノ酸配列を有する dsRNA 分解活性を有するタンパク質が挙げられる。

本発明の dsRNA 分解活性を有するタンパク質は、長鎖の dsRNA を特定の長さの dsRNA にすることができる。すなわち、本発明においては使用する dsRNA 分解活性を有するタンパク質を選択することにより、所望の特定の長さの dsRNA を調製することができる。当該特定の長さの dsRNA は、特に限定はされないが例えば、約 10～100 塩基対の範囲、好ましくは約 15～30 塩基対の範囲、特に好ましくは約 20～25 塩基対の範囲中の特定の長さの dsRNA が例示される。

さらに、本発明の dsRNA 分解活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば Dicer 変異体は、pH 8.5 以上のトリス-塩酸緩衝液中で塩化マグネシウムの存在下で保存することにより、4℃保存ならびに-20℃保存のいずれの場合においてもその活性を長期間安定に保持することができる。

本発明の dsRNA 分解活性を有するタンパク質は、下記（2）に記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA 結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態であっても良い。特に限定はされないが、上記 Dicer 変異体と核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA 結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質が例示される。

#### 【0028】

本発明の dsRNA 分解活性を有するタンパク質を製造するための方法としては、コドン宿主での発現に適したものに変換するか、あるいはレアコドンに対する補強すること

を含む方法であっても良い。特に限定はされないが例えば、発現遺伝子のコドン改変を含む製造方法であってもよく、当該タンパク質のアミノ酸配列の一部又は全てをタンパク発現の至適のコドン状態に変換したもの、もしくはそれに準じる状態の宿主を用いて発現させることができる。前記至適のコドン状態、もしくはそれに準じる状態の宿主としては、特に限定はされないが例えば、特定のコドンを認識するtRNA量を遺伝子工学的に通常この細胞中で産生する量よりも数倍以上高めた宿主が例示される。当該宿主としては、大腸菌が例示され、例えばアルギニンのコドン(AGA、AGG)のtRNAを補充した大腸菌、さらにイソロイシン(AUA)、プロリン(CCC)、ロイシン(CUA)のtRNAを補充した大腸菌等が挙げられる。

さらに、コドン改変を行って、宿主中での目的のタンパク質の発現を向上させる方法を用いても良く、その際にmRNAの2次構造を考慮にいれても良い。

すなわち、発現遺伝子のコドン変換、補強等によりタンパク発現が向上するような方法であれば特に限定はされない。

#### 【0029】

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造するためのベクターには、特に限定はなく、市販のベクター、発現系のいずれもが使用できる。特に、限定はされないが例えばpETシステム(ノバジェン社製)を用いることができる。さらに、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターが好適に使用でき、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

本発明の製造方法の一態様としては、上記Dicer変異体を低温で機能し得るプロモーターを有するベクター、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターで製造する方法が例示される。

すなわち、本発明の製造方法においては、特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を保持できるタンパク質を発現できるベクターであればいずれもが好適に使用できる。

また、当該特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を最終的に保持できるタンパク質を得られるならば、タンパク発現時は封入体の形態であるがその後のリホールディング操作により当該機能を回復できるものを発現できるベクターも含まれる。

本発明の方法の一態様、例えば上記Dicer変異体を製造する場合においては、従来のヒト由来Dicerの全長を発現させた場合に比較して、生産量が向上し、さらに当該タンパク質の活性保持体の取得率も向上させることができる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法においては、下記(2)に記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態で発現させる方法も含まれる。

#### 【0030】

(2) 本発明の核酸結合活性を有するタンパク質によるdsRNAの分解の促進方法並びに当該タンパク質を用いたRNA合成促進方法

本発明の特定の長さのdsRNAを生成することを特徴とするdsRNA分解の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパク質としては、結果的にdsRNA分解活性を促進するものであれば特に限定はなく、例えば、上記RNA結合活性を有するタンパク質等が好適に使用できる。

当該RNA結合活性を有するタンパク質としては特に限定はないが、コールド ショック プロテイン(Csp: cold shock protein)が例示される。特に常温域で機能し得るコールド ショック プロテインが好適に使用でき、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテインが好ましい。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列(配列表の配列番号10記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列)を有するサーモトガ マリティマ(Thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質が好適に使用できる。

当該CspBタンパク質をdsRNA分解活性を有するタンパク質と組み合わせることにより、当該dsRNA分解活性を促進させることができる。さらに本発明の方法は、上記(1)記載の特定の長さのdsRNAを生成させるdsRNA分解活性を有するタンパ

ク質、例えばDicer変異体、天然型Dicerあるいは市販のリコンビナントDicerのような機能的同等物のいずれにおいてもその特定の長さのdsRNAを生成させる活性を促進できる。

本発明の方法において、核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質を組み合わせることにより、当該dsRNA分解活性を促進させることができ、得られる分解産物は核酸結合活性を有するタンパク質を組合わせなかった場合の分解産物と比べて、RNA干渉作用において単位重量あたり同等の活性を有する。従って、核酸結合活性を有するタンパク質を使用することは、RNA干渉において非常に有用である。

さらに、本発明の方法においては、当該核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA合成活性を有するタンパク質は、dsRNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態のものであってもよい。

#### 【0031】

一方、本発明のRNA合成の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパク質としては、結果的にRNA合成活性を有するタンパク質のRNA合成活性を促進するものであれば特に限定はなく、核酸結合活性を有するタンパク質、コールド ショック プロテイン (Csp: cold shock protein) が好適に使用できる。当該コールド ショック プロテインは、特に限定はされないが好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のものが好適に使用できる。当該コールド ショック プロテインとしては特に限定はされないが、配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列 (配列表の配列番号10記載の塩基配列) を有するサーモトガ マリテイマ (Thermotoga maritima) 由来のCspBタンパク質が例示される。

当該CspBタンパク質をRNA合成系に共存させることにより、例えばRNAポリメラーゼのRNA合成活性を促進させることができる。当該タンパク質は、生成物が一本鎖あるいは二本鎖RNAのいずれの場合においても、その合成活性を促進することができる。

#### 【0032】

さらに、本発明のRNA合成の促進方法は、長鎖dsRNAのみならず、短鎖dsRNA、例えばsiRNAの合成に利用することができる。当該siRNA合成においては、特に限定はされないがT7 RNAポリメラーゼ等を用いて、好ましくは約15~30塩基対、特に好ましくは約20~25塩基対のものを合成する際に利用できる。

#### 【0033】

さらに本発明の方法においては、核酸結合活性を有するタンパク質がRNA合成活性を有するタンパク質によるdsRNAの合成ならびにdsRNA分解活性を有するタンパク質のdsRNA分解の二つの反応を促進するため、特にRNA干渉において重要なdsRNAの合成ならびにsiRNAの生成系に利用することができる。この場合、各タンパク質は別個であってよいし、融合タンパク質の形態であってよい。

#### 【0034】

(3) 本発明の方法に使用される組成物

本発明の組成物は、特定の長さのdsRNAに分解する反応及び／又はRNAの合成反応を効率よく行うための組成物である。

当該組成物は、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン (Csp: cold shock protein) が好適に使用でき、配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列 (配列表の配列番号10記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列) を有するサーモトガ マリテイマ (Thermotoga maritima) 由来のCspBタンパク質が好ましい。

#### 【0035】

本発明の組成物には、dsRNA分解活性を有するタンパク質及び／又はRNA合成活

性を有するタンパク質を含んでいてもよい。特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質としては、Dicerの機能ドメインを有するものが好ましく、例えば、RNaseIIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質が好適に使用できる。特に限定はされないが例えば、上記(1)記載のDicer変異体、天然型Dicerあるいは、市販のリコンビナントDicerのような機能的同等物のいずれであってもよい。当該Dicer変異体を含む組成物としては、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。また、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。

上記dsRNA分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列(例えば、Perfect DB配列等)、発現タンパク質精製のタグ配列(例えば、His tag配列等)、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列(例えば、Factor Xa配列等)などのアミノ酸配列を付加したタンパク質であってもよい。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12又は18記載のアミノ酸配列を有するdsRNA分解活性を有するタンパク質が挙げられる。さらに、本発明の組成物には、上記(1)記載のDicer変異体を安定化させるための緩衝液を含んでいてもよい。

#### 【0036】

さらに、RNA合成活性を有するタンパク質としては、例えばT7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ等が好適に使用できる。

さらに本発明の組成物の別態様としては、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質と特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び／又は核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

本発明の組成物は、特定の長さのdsRNAへの効率の良い分解及び／又は一本鎖あるいは二本鎖RNAの合成反応を簡便に行なうことができる。

#### 【0037】

また、本発明の組成物の一態様としては、長鎖dsRNAのみならず、短鎖dsRNA、例えばsiRNAの合成に利用することができる組成物が挙げられる。当該組成物は、約10～100塩基対、好ましくは約15～30塩基対、特に好ましくは約20～25塩基対のdsRNAを合成する際に有効である。

#### 【0038】

(4) 本発明の方法に使用されるキット

本発明の方法に使用されるキットは、特定の長さのdsRNAに分解する反応及び／又はRNAの合成反応を効率よく行うためのキットである。

当該キットは、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン(Csp: cold shock protein)が好適に使用でき、配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ マリティマ(Thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質が好適に使用できる。

#### 【0039】

本発明のキットには、特定の長さのdsRNAを生成する活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質及び／又はRNA合成活性を有するタンパク質を含んでいてもよい。該dsRNA分解活性を有するタンパク質及び／又はRNA合成活性を有するタンパク質としては、上記(3)で挙げられたものが好適に使用できる。さらに、本発明のキットには、上記(1)記載のDicer変異体を安定化させるための緩衝液を含んでいて

もよい。

さらに本発明のキットの別態様としては、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質と特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び／又は核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

さらに、本発明のキットには、上記以外のコンポーネント、例えば反応の結果生成された特定の長さのdsRNAを精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。特に限定はされないが例えば、約21塩基対のsiRNAを精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。

本発明のキットを用いることで、特定の長さのdsRNAへの効率の良い分解及び／又はRNAの合成を簡便に行なうことができる。

#### 【0040】

また本発明のキットの一態様としては、長鎖dsRNAのみならず、短鎖dsRNA、例えばsiRNAの合成に利用することができるキットが挙げられる。当該キットは、約10～100塩基対、好ましくは約15～30塩基対、特に好ましくは約20～25塩基対のdsRNAを合成する際に有効である。

#### 【実施例】

##### 【0041】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については2001年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラー クローニング：ア ラボラトリー マニュアル第3版 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual 3rd ed.) に記載の方法によった。

##### 【0042】

実施例1 ヒト由来DicerのRNase IIIドメインの発現

##### (1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号1記載のヒト由来Dicer アミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸1271～1924 (塩基番号3811～5772) よりなるポリペプチドを発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号5及び6記載の塩基配列を有する合成プライマー1及び2をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー1は、制限酵素KpnIの認識配列を塩基番号9～14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列 (配列番号1) のアミノ酸番号1271～1277に相当する塩基配列を塩基番号16～36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー2は、制限酵素HindIIIの認識配列を塩基番号9～14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列 (配列番号1) のアミノ酸番号1919～1924に相当する塩基配列を塩基番号18～36にもつ。

##### 【0043】

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、鋳型DNA (ヒトcDNAライブラリー、Human Pancreas、タカラバイオ社製) 2 $\mu$ l、5 $\mu$ lの10 $\times$ LA PCR buffer (タカラバイオ社製)、5 $\mu$ lのdNTP混合液 (タカラバイオ社製)、10pmolの合成プライマー1、10pmolの合成プライマー2、0.5UのTakara LA Taq (タカラバイオ社製) を加え、滅菌水を加えて全量を50 $\mu$ lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ社製) にセットし、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

## 【0044】

反応終了後、該反応液5 $\mu$ lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約2kbpのDNAフラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを5 $\mu$ lの滅菌水に懸濁し、制限酵素KpnI（タカラバイオ社製）及び制限酵素HindIII（タカラバイオ社製）で2重消化し、1.0%アガロース電気泳動によりそのKpnI-HindIII消化物を抽出精製し、KpnI-HindIII消化DNA断片を得た。

## 【0045】

次に国際公開第99/27117号パンフレットの実施例1～6記載の方法に従い、pCold08NC2ベクターを調製した。

次に上記pCold08ベクターを上記KpnI-HindIII消化DNA断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記KpnI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20 $\mu$ lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5%（w/v）濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50 $\mu$ g/ml含む）上で生育させた。

## 【0046】

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シークエンシングすることにより確認し、この組み換えプラスミドをpCold08 hDi-Rとした。当該プラスミドは、pLasmiD pCold08 hDi-Rと命名、表示され、平成15年8月11日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566））にFERM P-19482として寄託されている。このpCold08 hDi-Rは、ヒト由来Dicer アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸番号1271～1924のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、Perfect DB配列、His tag配列、並びにFactor Xa配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号12に、塩基配列を配列表の配列番号13に示す。

## 【0047】

(2) 発現、精製及び各種buffer条件でのサンプル調製

上記(1)で調製したpCold08 hDi-Rを用いて大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5%（w/v）濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50 $\mu$ g/ml含む）上で生育させた。生育したコロニーを2.5mlのLB液体培地（アンピシリン50 $\mu$ g/ml含む）に植菌し、37℃で一晩培養した。この一部を100mlの同LB培地に植菌し、37℃で対数増殖期まで培養した。前記培養後、15℃に保温したインキュベーター内で10分間振とうした後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのまま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5mlの細胞破碎溶液[50mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、1% Triton（トライトン）X-100、1mM ジチオスレイトール、2mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離（11,000rpm 20分）により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

## 【0048】

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして1ml分のNi-NTA agarose（キアゲン社製）にbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100]を10ml添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1mlの樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約5mlの上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリ

ーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂をφ15 mmのカラムに充填し、5 mlのbuffer Aで2回洗浄した。次に5 mlのbuffer B [20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール、0.1% トライトンX-100、40 mM イミダゾール] で樹脂を洗浄後、5 mlのbuffer C [20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5)、800 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール、0.1% トライトンX-100、40 mM イミダゾール]、続いて5 mlのbuffer Bで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

#### 【0049】

洗浄後、3 mlのbuffer D [20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール、0.1% トライトンX-100、100 mM イミダゾール] で溶出操作を行った。次に、500 mlのbuffer E [50 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0)、100 mM 塩化ナトリウム、0.5 mM EDTA、0.1% トリトンX-100、1 mM ジチオスレイトール] で透析を行ない、その後、セントリコン (アミコン社製) を用いて約10倍まで濃縮を行なった。この精製濃縮サンプルの一部について10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、分子量約76,800のところに目的タンパク質のバンドが確認された。さらに、当該サンプルについてAnti His HRP Conjugate (キアゲン社製) を用い、その添付プロトコルに従って抗Hisタグ抗体を用いたウエスタンブロッティング検出を行なったところ、目的のタンパク質バンドが発色検出された。以下、このヒト由来Dicer RNase IIIドメインタンパク質をhDiRと称する。

#### 【0050】

さらに上記方法ではbuffer Dでの溶出後、buffer E (これをタンパク質サンプルIとする) で透析を行なっているが、タンパク形状緩衝液の条件設定のため、以下の組成の緩衝液での透析も同様にして実施した。

1: buffer Fを用いた透析 [50 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1% トリトンX-100、1 mM ジチオスレイトール] →タンパク質サンプルII

2: buffer Gを用いた透析 [50 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1% トリトンX-100、1 mM ジチオスレイトール] →タンパク質サンプルIII

3: buffer Hを用いた透析 [50 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.8)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1% トリトンX-100、1 mM ジチオスレイトール] →タンパク質サンプルIV

#### 【0051】

### 実施例2 dsRNA分解活性の測定

#### (1) 反応液の調製

上記実施例1-(2)で調製したタンパク質サンプルI~IVについてそのDicer活性を測定した。当該活性測定は以下のようにして行った。

まず、活性測定に用いた基質となるdsRNAは、TurboScript T7 Transcription kit (GTS社製) を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。

すなわち、プラスミドpQBI125 (和光純薬社製) に挿入されているRed-shift Green Fluorescent Protein (以下GFPと略称する) をコードする遺伝子 (配列表の配列番号11) について、プラスミドpDON-AI (タカラバイオ社製) に挿入したpDON-rsGFPを鋳型とし、配列表の配列番号7記載のT7プロモーター配列をもった合成プライマー3と配列表の配列番号8記載の合成プライマー4を用いてPCRを行い、増幅産物を得た。次に得られた2本鎖DNAを鋳型として、T7 RNA polymeraseによるRNA合成反応により約700 bpの長さのdsRNAを調製した。

## 【0052】

上記方法で調製したdsRNA 1 $\mu$ g、上記(2)で調製したhDiR 1 $\mu$ l、10mM ATP溶液 1 $\mu$ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 1 $\mu$ l、5 $\times$ 反応緩衝液(それぞれ最終透析に用いた緩衝液の5倍濃縮したもの) 2 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。

## 【0053】

また、市販のDicer (GTS社製)の場合は、Dicer酵素液2 $\mu$ l、基質となるdsRNA 1 $\mu$ g、10mM ATP溶液 1 $\mu$ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 0.5 $\mu$ l、付属の反応緩衝液 4 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。

## 【0054】

以上の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ Cで17時間反応後、5 $\mu$ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。電気泳動後にエチジウムブロマイド染色したゲルより、約21ヌクレオチドの分解産物の確認されたものを活性有とした。

## 【0055】

## (2) 活性測定

上記(1)で調製した反応液の活性測定を行い、RNase IIIドメインタンパク質(hDiR)への影響を検討した。さらに、各緩衝液中における安定性についても検討するため、精製直後のサンプルを用いた場合と、4 $^{\circ}$ C及び-20 $^{\circ}$ C条件で5日間保存したサンプルを用いた。その結果、特にタンパク質サンプルIII、タンパク質サンプルIVにおいては、4 $^{\circ}$ C保存ならびに-20 $^{\circ}$ C保存のいずれの場合においても市販Dicerと同じ大きさの約21ヌクレオチドの分解産物が確認され、その活性を安定に保持していることが確認できた。

## 【0056】

以上のことから、ヒト由来DicerのRNase IIIドメインタンパク質(hDiR)は、pH8.5以上のトリス-塩酸緩衝液中、塩化マグネシウムが存在する条件で保存することで活性を安定化できることが判明した。

## 【0057】

## 実施例3 dsRNA生産及び分解に寄与する因子の検討

(1) dsRNA生産及び分解に寄与する因子を検討するために、常温域で核酸結合活性を有するタンパク質について検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質は入手が困難であった。従って、配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ マリティマ(Thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質をモデルタンパク質として用いた。当該タンパク質は、プロテインサイエンス(Protein Science)第8巻、394-403頁(1999)記載の方法で調製した。

## 【0058】

## (2) サーモトガ マリティマ由来CspBのdsRNA分解への効果

CspBを添加した形でのdsRNA分解活性は以下のように測定した。

すなわち、hDiRを酵素として用いた場合、実施例1-(2)で調製したhDiR(酵素液) 1 $\mu$ l、上記(1)で調製したCspB溶液 1 $\mu$ l、基質として実施例2-(1)で使用したdsRNA 1 $\mu$ g、10mM ATP溶液 1 $\mu$ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 1 $\mu$ l、5 $\times$ 反応緩衝液[250mM トリス-塩酸(pH8.5)、500mM 塩化ナトリウム、0.5% Triton X-100、5mM DTT] 2 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて、容量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。また市販のDicerの場合は、添付資料記載の組成に基質となるdsRNAを1 $\mu$ g加え、これにnuclease free水を加えて、容量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。なお市販のDicerについては、GTS社、Stratagene社、Invitrogen社のものを使用した。

## 【0059】

添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で4.6 ng/ $\mu$ l、9.2 ng/ $\mu$ l、18.4 ng/ $\mu$ l、92 ng/ $\mu$ lになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1  $\mu$ l添加した。

## 【0060】

以上の反応液を調製し、37℃で18時間反応後、5  $\mu$ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い分解産物を確認した。さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行なった。その結果、市販Dicer及びRNase IIIドメインタンパク質(hDir)のいずれの場合においてもCspB添加によるdsRNAの分解量の向上が全ての添加量に関して確認できた。特に9.2 ng/ $\mu$ lの前後で分解量が向上することが確認できた。

## 【0061】

すなわち、CspBを反応液中に添加することで、市販のDicer、RNase IIIドメインタンパク質のいずれにおいてもdsRNA分解産物がより多く得られることが明らかとなった。

## 【0062】

## (3) サーモトガ マリティマ由来CspBのRNA合成への効果

RNA干渉においては、dsRNAを合成するためにRNA合成系の活性を促進することも重要であるとの見地に基づき、サーモトガ マリティマ由来CspBのRNA合成への効果を検討した。モデル系として、T7 RNAポリメラーゼ系を選択した。RNA合成系への影響については以下のようにして行なった。すなわち、CspBを添加した形でのT7 RNAポリメラーゼによる転写量を目安とした。常法により調製したT7プロモーターを有するpET16b (ノバジェン社製)に配列表の配列番号11記載の塩基配列を有するrsGFP遺伝子を導入したプラスミドを鋳型DNAとして1  $\mu$ g、10×T7 RNAポリメラーゼ用緩衝液(タカラバイオ社製) 2  $\mu$ l、50mM DTT 2  $\mu$ l、RNase インヒビター(タカラバイオ社製) 0.4  $\mu$ l、25mM NTP 2  $\mu$ l、T7 RNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製) 1  $\mu$ l、CspB溶液 1  $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて容量を20  $\mu$ lとしたものを反応液とし、37℃で4時間反応させた。なお本実施例でCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/ $\mu$ l、180 ng/ $\mu$ l、460 ng/ $\mu$ l、920 ng/ $\mu$ lになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1  $\mu$ l添加した。

反応後のサンプル2  $\mu$ lに、10×MOPS緩衝液(200mM MOPS、50mM 酢酸ナトリウム、10mM EDTA、10mM EGTA) 2  $\mu$ l、ホルムアルデヒド 2  $\mu$ l、脱イオン化ホルムアミド 9  $\mu$ l及びnuclease free水 3  $\mu$ lを添加して70℃、10分間保温し、その後水中で1分間インキュベートした。これに10×loading buffer 2  $\mu$ lを添加して、1×MOPS緩衝液中でエチジウムブロマイドを含む1.25%アガロースゲルを用いて電気泳動解析を行なった。そのゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、T7 RNAポリメラーゼによって合成されたmRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が460 ng/ $\mu$ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約2倍以上に、さらに920 ng/ $\mu$ l添加した場合は約3倍になることが確認できた。

## 【0063】

## (4) サーモトガ マリティマ由来CspBのdsRNA合成への効果

次にサーモトガ マリティマ由来CspBのdsRNA合成に対する影響について検討

した。本実施例においては、実施例2-(1)で調製したdsRNA合成用鋳型を利用した。RNAへの転写については、市販のTurboScript T7 Transcription kit (ジーンセラピーシステムズ社製)を用いて、その添付プロトコルに従った。なお、この際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/ $\mu$ l、180 ng/ $\mu$ l、460 ng/ $\mu$ l、920 ng/ $\mu$ lになるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)を1  $\mu$ l添加した。37℃、4時間反応後に1  $\mu$ lのDNase Iを添加し、37℃で15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液1  $\mu$ lをエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルを上記(3)と同様の方法でT7 RNAポリメラーゼによって合成されたdsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920 ng/ $\mu$ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約2倍以上なることが確認できた。

#### 【0064】

上記実施例と同様に別態様のT7 RNAポリメラーゼ転写系についても検討した。すなわち、実施例2-(1)で調製したdsRNA合成用鋳型1  $\mu$ g、10×T7 RNAポリメラーゼ緩衝液(タカラバイオ社製) 1  $\mu$ l、50 mM DTT 1  $\mu$ l、RNase インヒビター(タカラバイオ社製) 0.2  $\mu$ l、25 mM NTP 1  $\mu$ l、T7 RNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製) 0.5  $\mu$ l、CspB溶液 1  $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて容量を10  $\mu$ lとしたものを反応液とし、37℃で4時間反応させた。なおこの際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/ $\mu$ l、180 ng/ $\mu$ l、460 ng/ $\mu$ l、920 ng/ $\mu$ lになるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)を1  $\mu$ l添加した。反応後のサンプルにDNase I(タカラバイオ社製)を0.5  $\mu$ l加えて、37℃で15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液1  $\mu$ lをエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルについてもdsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920 ng/ $\mu$ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約3倍以上なることが確認できた。

#### 【0065】

以上のように、CspBを反応液中に添加することで、T7 RNAポリメラーゼによる転写産物がより多く得られることが明らかとなった。この効果は、1本鎖RNA合成ならびに2本鎖RNA合成のいずれの場合においても確認できた。

#### 【0066】

実施例4 ヒト由来DicerのPAZ+RNase IIIドメインの発現

##### (1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号1記載のヒト由来Dicer アミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸679~1924(塩基番号2035~5772)よりなるポリペプチドを発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号14及び15記載の塩基配列を有する合成プライマー5及び6をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー5は、制限酵素Kpn Iの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号679~685に相当する塩基配列を塩基番号16~36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー6は、制限酵素Hind IIIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1919~1924に相当する塩基配列を塩基番号18~35にもつ。

#### 【0067】

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、鋳型DNA(ヒトcDNAライブラリー、Human Pancreas、

タカラバイオ社製) 2  $\mu$ l、5  $\mu$ lの10 $\times$ LA PCR buffer (タカラバイオ社製)、5  $\mu$ lのdNTP混合液 (タカラバイオ社製)、10 pmolの合成プライマー5、10 pmolの合成プライマー6、0.5 UのTakara LA Taq (タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を50  $\mu$ lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ社製)にセットし、94  $^{\circ}$ C 1分、55  $^{\circ}$ C 1分、72  $^{\circ}$ C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

#### 【0068】

反応終了後、該反応液5  $\mu$ lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約2.7 kbpのDNAフラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを5  $\mu$ lの滅菌水に懸濁し、制限酵素KpnI (タカラバイオ社製)及び制限酵素HindIII (タカラバイオ社製)で2重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのKpnI-HindIII消化物を抽出精製し、KpnI-HindIII消化DNA断片を得た。

#### 【0069】

次に実施例1-(1)で調製したpCold08NC2ベクターを上記KpnI-HindIII消化DNA断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記KpnI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキット (タカラバイオ社製)を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20  $\mu$ lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地 (アンピシリン50  $\mu$ g/ml含む)上で生育させた。

#### 【0070】

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、この組み換えプラスミドをpCold08 hDi-ASIとした。当該プラスミドは、plasmid pCold08 hDi-ASIと命名、表示され、平成15年9月26日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 (郵便番号305-8566))にFERM P-19536として寄託されている。このpCold08 hDi-ASIは、ヒト由来Dicerアミノ酸配列 (配列番号1)のアミノ酸番号679~1924のアミノ酸配列をコードする塩基配列 (配列表の配列番号16記載の塩基配列、配列番号17記載のアミノ酸配列)を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、Perfect DB配列、His tag配列、並びにFactor Xa配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号18に、塩基配列を配列表の配列番号19に示す。

#### 【0071】

##### (2) 発現、精製

上記(1)で調製したpCold08 hDi-ASIを用いて大腸菌BL21-DonPlus-RIL strain (ストラタジーン社製)を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地 (アンピシリン50  $\mu$ g/ml含む)上で生育させた。生育したコロニーを2.5 mlのLB液体培地 (アンピシリン50  $\mu$ g/ml含む)に植菌し、37  $^{\circ}$ Cで一晩培養した。この一部を100 mlの同LB培地に植菌し、37  $^{\circ}$ Cで対数増殖期まで培養した。前記培養後、15  $^{\circ}$ Cに保温したインキュベーター内で10分間振とうした後、IPTGを終濃度1.0 mMになるように添加し、そのまま15  $^{\circ}$ Cで24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5 mlの細胞破碎溶液 [50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1% トライトンX-100、1 mM ジチオスレイトール、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離 (11,000 rpm 20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

## 【0072】

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして1ml分のNi-NTA agarose (キアゲン社製) にbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、1mM 塩化マグネシウム、0.1% トライトンX-100] を10ml添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1mlの樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約5mlの上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂をφ15mmのカラムに充填し、5mlのbuffer Aで2回洗浄した。次に5mlのbuffer B [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% トライトンX-100、40mM イミダゾール] で樹脂を洗浄後、5mlのbuffer C [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、800mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% トライトンX-100、40mM イミダゾール]、続いて5mlのbuffer Bで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

## 【0073】

洗浄後、3mlのbuffer D [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% トライトンX-100、100mM イミダゾール] で溶出操作を行った。次に、500mlのbuffer E [50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1% トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール] で透析を行ない、その後、セントリコン (アミコン社製) を用いて約10倍まで濃縮を行なった。その一部について10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、大腸菌BL21-Codon Plus-RIL strain (ストラタジーン社製) を宿主として用いたサンプルで分子量約144,000のところに目的タンパク質のバンドが確認され、これを以下の活性の確認に使用した。以下、このヒト由来Dicer PAZ+RNase IIIドメインタンパク質をhDi-ASIとする。

## 【0074】

## (3) dsRNA分解活性の測定

上記実施例4-(2)で調製したタンパク質サンプルについて、実施例2記載の方法でそのdsRNA分解活性を測定した。

その結果、電気泳動後にエチジウムブロマイド染色したゲルより、約21ヌクレオチドの分解産物が確認され、RNase IIIドメインタンパク質 (hDiR) とPAZ領域を含むタンパク質 (hDi-ASI) においてもdsRNA分解活性が確認された。

## 【0075】

さらに、凍結・融解における安定性についても検討するため、-80℃条件で上記タンパク質サンプルを凍結、その後、室温で融解させるという操作を6回、及び10回繰り返した。また、コントロールとして実施例1-(2)で調製したhDiRについても同様の検討を行った。

その結果、PAZ+RNase IIIドメインタンパク質 (hDi-ASI) の場合、凍結・融解を6回、10回繰り返しても分解活性を保持していた。一方、hDiRについては6回の凍結・融解まで活性は確認された。このことから、RNase IIIドメインにさらにPAZドメインを含むことにより当該タンパク質は、より多くの凍結・融解に対する安定性を獲得することが確認できた。

## 【0076】

## (4) 分解に寄与する因子についての検討

上記実施例4-(2)で調製したhDi-ASIについて、常温域で核酸結合活性を有

するタンパク質の影響を検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質としては、上記実施例3で調製したサーモトガマリティマ由来のCspBタンパク質を用いた。また、dsRNA分解への効果については、以下のように測定した。

すなわち、実施例4-(2)で調製したhDi-ASI(酵素液)1 $\mu$ l、実施例3で調製したCspB溶液1 $\mu$ l、基質となるdsRNA1 $\mu$ g、10mM ATP溶液1 $\mu$ l、50mM 塩化マグネシウム溶液1 $\mu$ l、5 $\times$ 反応緩衝液[250mM トリス-塩酸(pH8.5)、750mM 塩化ナトリウム、0.5%トライトンX-100、5mM DTT]を2 $\mu$ l、これにnuclease free水を加えて、容量を10 $\mu$ lとしたものを反応液とした。CspBタンパク質の濃度は終濃度で9.2ng/ $\mu$ l、18.4ng/ $\mu$ l、92ng/ $\mu$ lになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1 $\mu$ l添加した。

以上の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ Cで17時間反応後、5 $\mu$ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い切断産物を確認した。さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11(Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行なった。

その結果、hDi-ASIの場合においても、CspB添加によるdsRNAの分解量の向上が確認できた。特に9.2ng/ $\mu$ lの前後で分解量が向上することが確認できた。

#### 【0077】

すなわち、CspBは、RNase IIIドメインを含む天然型、あるいは変異型のヒト由来DicerのいずれにおいてもそのdsRNA分解活性を促進することが確認できた。

#### 【0078】

##### 実施例5

本発明のヒト由来hDiRを用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について検討した。対照として、市販のDicer(GTS社)を用いた。dsRNA分解産物の調製は、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載のhDiR並びに市販のDicerを10単位用いて、dsRNA10 $\mu$ g分を、37 $^{\circ}$ C、18時間で切断した。これらの切断産物をRNA Purification Column 1, 2(Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

#### 【0079】

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、10%FBSおよび1%penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地(SIGMA社製)で適当量(細胞数:5 $\times$ 10<sup>4</sup>)24wellプレートにまき、一晚CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。約80%コンフルントになった状態で50 $\mu$ lの無血清培地に3 $\mu$ lのTransIT 293 Transfection Reagent(タカラバイオ社製)を加え、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、0.3 $\mu$ gのpQBI25(和光純薬社製)を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。そこに4 $\mu$ lのTransIT-TKO試薬を加えて穏やかに混和し、室温で5分間放置した。そこに上記siRNAを500ng加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置し、これをDNA/siRNA溶液とした。Well中の10%FBSを含むD-MEM培地を250 $\mu$ lになるように添加したものに、DNA/siRNA溶液を滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、0.3 $\mu$ gのpQBI25(和光純薬社製)のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、ベ

クター (DNA) のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表1に示す。

【0080】

【表1】

| 導入サンプル          | 平均蛍光強度  |
|-----------------|---------|
| コントロール (無添加)    | 8.09    |
| コントロール (ベクターのみ) | 1331.44 |
| hDiR            | 14.92   |
| 市販Dicer         | 71.57   |

【0081】

表1に示したように、コントロール (ベクターのみ) と比較してその平均蛍光値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDiRによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示し、市販Dicerのものよりも強いRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のhDiRがRNA干渉のためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【0082】

#### 実施例6

本発明のhDiRを用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について、siRNAの添加量を換えて検討した。対照として、市販のDicer (Gene Therapy Systems社製) を用いた。dsRNAの切断については、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載のhDiR並びに市販のDicerを10 $\mu$ l用いて、dsRNA10 $\mu$ g分を、37 $^{\circ}$ C、18時間で切断した。なおこの際には、実施例3-(2)で使用したCspBを最終濃度9.2ng/ $\mu$ lになるように添加し、反応させた。

これらの切断産物をRNA Purification Column 1、2 (Gene Therapy Systems社製) を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0083】

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、10%FBSおよび1%penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地 (SIGMA社製) で適当量 (cell数:  $1.5 \times 10^5$ ) を24wellプレートにまき、一晚CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。この培養細胞が約95%コンフルントになった時点で、49 $\mu$ lの無血清培地に1 $\mu$ lのGenejuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製) を加え、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、0.3 $\mu$ gのpQBI25 (和光純薬社製) を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

同時に、別チューブに47 $\mu$ lの無血清培地に3 $\mu$ lのRibojuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製) を加えたものを用意し、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、上記siRNA 166.7ng、55.6ng、18.5ngを加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

このように調製した2種類の溶液を、Well中の10%FBSを含むD-MEM培地を250 $\mu$ lになるように添加したものに滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、ベクター (DNA) のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage (ベクトン・ディッキンソン社製) を用いたフローサイトメトリーに供し、ベクター (DNA) のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のrsGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表2に示す。

【0084】

【表2】

| 導入サンプル           | 平均蛍光強度 (相対値) |
|------------------|--------------|
| コントロール (無添加)     | 0            |
| コントロール (ベクターのみ)  | 100          |
| hDiR 166.7 ng    | 18.21        |
| hDiR 55.6 ng     | 18.97        |
| hDiR 18.5 ng     | 32.67        |
| 市販Dicer 166.7 ng | 17.74        |
| 市販Dicer 55.6 ng  | 19.80        |
| 市販Dicer 18.5 ng  | 32.34        |

【0085】

表2に示したように、コントロール (ベクターのみ) と比較して平均蛍光強度の値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDiRによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のhDiRがRNA干渉のためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【0086】

上記細胞サンプルについてtotal RNAを抽出しreal time RT-PCRに供しrsGFPのmRNAを定量する事で、RNA干渉の評価を行った。

【0087】

すなわち、siRNA導入後CO<sub>2</sub> インキュベーターで37℃、24時間培養した細胞からtrizole (Invitrogen社製) を使用してトータルRNAを抽出、精製した。なおこの際の作業は、添付のプロトコルに従って行った。そのトータルRNAを80 ng、5×M-MLV buffer (タカラバイオ社製) 4 μl、10 mM dNTP (タカラバイオ社製) 1 μl、random hexamer 100 pmol、RNase Inhibitor (タカラバイオ社製) 20 U、M-MLV Reverse Transcriptase 100 U、を加え、滅菌水で全量を20 μlとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ社製) にセットし、42℃ 10分、95℃ 2分の反応を行った。この反応液に20 μlの反応希釈液 (1×M-MLV buffer、0.5 mM dNTP mixture) を加え、これを10 μlずつに分注した。前述の反応物10 μlに、10×R-PCR buffer (タカラバイオ社製) 2.5 μl、250 mM Mg<sup>2+</sup> 0.3 μl、10 mM dNTP 0.75 μl、TaKaRa Ex Taq R-PCR (タカラバイオ社製) 1.25 U、滅菌水で3000倍希釈したSYBR Green (タカラバイオ社製) 2.5 μl、100% DMSO 1.25 μlを加え、β-actin (タカラバイオ社製)、GAPDH (タカラバイオ社製)、rsGFP (rsGFP-F: 配列番号20、rsGFP-R: 配列番号21)、Neo (Neo-F: 配列番号22、Neo-R: 配列番号23) を検出するための合成プライマーを5 pmolずつ加え、滅菌水で全量を25 μlとした。前記反応液をSmart Cycler II Unit (タカラバイオ社製) にセットし、95℃、10秒で熱変性を行った後、95℃ 5秒、60℃ 20秒を1サイクルとする45サイクルの反応を行なった。得られたデータを解析することで、ヒト由来のβ-actin、GAPDH、および導入プラスミド由来のrsGFP、NeoのmRNA量を定量した。その結果を表3に示す。

【0088】

【表 3】

| 導入サンプル           | r s G F P mRNA量 (相対値) |
|------------------|-----------------------|
| コントロール (無添加)     | 0                     |
| コントロール (ベクターのみ)  | 100                   |
| hDiR 166.7 ng    | 15.92                 |
| hDiR 55.6 ng     | 22.72                 |
| hDiR 18.5 ng     | 30.61                 |
| 市販Dicer 166.7 ng | 14.77                 |
| 市販Dicer 55.6 ng  | 30.91                 |
| 市販Dicer 18.5 ng  | 35.84                 |

## 【0089】

表3に示したように、コントロール (ベクターのみ) と比較して r s G F P の mRNA 量が小さいほど RNA 干渉が起こっている。従って、hDiR は、市販 Dicer と同様に RNA 干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明の hDiR は、RNA 干渉のための siRNA 調製に有用であることが確認できた。

## 【0090】

## 実施例 7

上記実施例 1-(2)、実施例 4-(2) で調製したサンプルについてその dsRNA 分解活性の基質となる dsRNA をルシフェラーゼ遺伝子より作製し評価した。実施例 2-(1) と同様に dsRNA は、TurboScript T7 Transcription kit (GTS 社製) を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。

## 【0091】

すなわち、プラスミド pGL3-Basic ベクター (プロメガ社製) に挿入されているルシフェラーゼをコードする遺伝子について、プラスミド pGL3-Basic ベクター (プロメガ社製) を鋳型とし、配列表の配列番号 24 記載の T7 プロモーター配列をもった ds1-1 プライマーと配列表の配列番号 25 記載の ds1-2 プライマーを用いて PCR (増幅断片長約 500 塩基対) を行い、増幅産物を得た。次に得られた 2 本鎖 DNA を鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼによる RNA 合成反応により約 500 bp の長さの dsRNA を調製した。

## 【0092】

本発明の hDiR、hDi-ASI を用いて調製した siRNA の RNA 干渉の効果について検討した。対照として、市販の Dicer (Gene Therapy Systems 社製) を用いた。dsRNA の切断については、基本的に上記実施例 2-(1) 記載の方法で行った。すなわち、実施例 1-(2) 記載の hDiR、実施例 4-(2) 記載の hDi-ASI 並びに市販の Dicer を 10  $\mu$ l 用いて、上記の dsRNA 10  $\mu$ g 分を、37℃、18 時間で切断した。なおこの際には、実施例 3-(2) で使用した CspB を最終濃度 9.2 ng/ $\mu$ l になるように添加し、反応させた。

これらの切断産物を RNA Purification Column 1、2 (Gene Therapy Systems 社製) を用いて精製し、これらを以下の RNA 干渉の評価に使用した。

## 【0093】

すなわち、siRNA 導入を行なう 24 時間前に 293 細胞を、10% FBS および 1% penicillin/streptomycin を含む D-MEM 培地 (SIGMA 社製) で適当量 (cell 数:  $1.5 \times 10^5$ ) 24 well プレートにまき、一晚 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。この培養細胞が約 95% コンフレントになった時点で、49  $\mu$ l の無血清培地に 1  $\mu$ l の Genejuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製) を加え、激しく攪拌した。室温で 5 分間放置し、0.5  $\mu$ g の pGL3-control と 0.1  $\mu$ g の pRL-TK (Promega 社製)

を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

同時に、別チューブに47 $\mu$ lの無血清培地に3 $\mu$ lのRibojuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加えたものを用意し、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、上記siRNAを166.7ng、55.6ng、18.5ngを加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

このように調製した2種類の溶液を、Well中の10%FBSを含むD-MEM培地を250 $\mu$ lになるように添加したものに滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、ベクター (DNA) のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をDual Luciferase Reporter assay kit (Promega社製)を用いたアッセイに供することで、ベクター (DNA) のみを導入したものに対する、siRNAを添加した場合のGL3タンパク質発現の阻害効果を測定した。その結果を表4に示す。

【0094】

【表4】

| 導入siRNAサンプル     | GL3発現量：相対値 |
|-----------------|------------|
| コントロール (無添加)    | 0          |
| コントロール (ベクターのみ) | 100        |
| hDiR 166.7ng    | 25.70      |
| hDiR 55.6ng     | 38.90      |
| hDiR 18.5ng     | 74.51      |
| hDi-ASI 166.7ng | 25.87      |
| hDi-ASI 55.6ng  | 25.00      |
| hDi-ASI 18.5ng  | 31.09      |
| 市販Dicer 166.7ng | 25.11      |
| 市販Dicer 55.6ng  | 30.15      |
| 市販Dicer 18.5ng  | 55.41      |

【0095】

表4では、コントロール (ベクターのみ)と比較してそのGL3発現量の値が小さいほどRNA干渉が起こっていると考えられる。従って、hDiR、hDiASIによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のhDiR、hDiASIがRNA干渉のためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【0096】

#### 実施例8

本発明のhDiR、hDi-ASIを用い、CspBを添加して調製したsiRNAと無添加で調製したsiRNAについて、そのRNA干渉の効果について検討した。なお実際の操作は実施例7記載のルシフェラーゼを用いた方法に習った。対照として、市販のDicer (Gene Therapy Systems社製)を用いた。dsRNAの切断については、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載の方法で調整したhDiR、実施例4-(2)記載の方法で調整したhDi-ASI並びに市販のDicerを10 $\mu$ l用いて、上記のdsRNA10 $\mu$ g分を、37℃、18時間で切断した。なおこの際には、実施例3-(2)で使用したCspBを最終濃度9.2ng/ $\mu$ lになるように添加した場合と添加しない場合とで反応させた。

これらの切断産物をRNA Purification Column 1, 2 (Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0097】

【表 5】

| 導入 s i RNA サンプル     | GL 3 発現量: 相対値 |
|---------------------|---------------|
| コントロール (無添加)        | 0             |
| コントロール (ベクターのみ)     | 100           |
| hDiR 55.6ng+CspB    | 9.66          |
| hDiR 55.6ng         | 16.40         |
| hDi-ASI 55.6ng+CspB | 14.31         |
| hDi-ASI 55.6ng      | 13.19         |
| 市販Dicer 55.6ng+CspB | 10.40         |
| 市販Dicer 55.6ng      | 12.07         |

## 【0098】

表5では、コントロール (ベクターのみ) と比較してそのGL 3発現量の値が小さいほどRNA干渉が起こっていると考えられる。従って、CspBの添加、無添加サンプルの間に、RNA干渉効果の差はないことを示した。

以上のことからRNA干渉のためのs i RNA調製の際に、本発明のCspBがs i RNAに対し、質的な影響を与えないことが確認できた。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0099】

本発明により特定の長さのdsRNAを生成するdsRNA分解活性を有するタンパク質が提供される。また、本発明の方法によりRNA干渉等において有用な、特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び／又はRNA合成促進方法が提供される。さらに本発明の特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び／又はRNA合成促進方法を簡便に実施することができる組成物ならびにキットが提供される。

## 【配列表フリーテキスト】

## 【0100】

SEQ ID NO:3; A gene encoding human dicer mutant  
 SEQ ID NO:4; An amino acid sequence of human dicer mutant  
 SEQ ID NO:5; Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer mutant  
 SEQ ID NO:6; Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer mutant  
 SEQ ID NO:7; Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
 SEQ ID NO:8; Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein  
 SEQ ID NO:14; Synthetic primer 5 to amplify a gene encoding human dicer mutant  
 SEQ ID NO:15; Synthetic primer 6 to amplify a gene encoding human dicer mutant  
 SEQ ID NO:16; A gene encoding human dicer mutant  
 SEQ ID NO:17; An amino acid sequence of human dicer mutant  
 SEQ ID NO:18; An amino acid sequence of human dicer mutant  
 SEQ ID NO:19; A gene encoding human dicer mutant  
 SEQ ID NO:20; Synthetic primer rsGFP-F to amplify a gene encoding rsGFP  
 SEQ ID NO:21; Synthetic primer rsGFP-R to amplify a gene encoding rsGFP  
 SEQ ID NO:22; Synthetic primer Neo-F to amplify a gene encoding Neo  
 SEQ ID NO:23; Synthetic primer Neo-R to amplify a gene encoding Neo  
 SEQ ID NO:24; Synthetic primer dsl-1 to amplify a gene encoding luciferase  
 SEQ ID NO:25; Synthetic primer dsl-2 to amplify a gene encoding luciferase

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; TAKARA BIO INC.

<120> The protein which has dsRNA decomposition activity, the dsRNA decomposition method and the RNA synthesis method using the protein which has nucleic acid binding activity

&lt;130&gt; T-1866

&lt;160&gt; 25

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1924

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Lys Ser Pro Ala Leu Gln Pro Leu Ser Met Ala Gly Leu Gln Leu  
1 5 10 15

Met Thr Pro Ala Ser Ser Pro Met Gly Pro Phe Phe Gly Leu Pro Trp  
20 25 30

Gln Gln Glu Ala Ile His Asp Asn Ile Tyr Thr Pro Arg Lys Tyr Gln  
35 40 45

Val Glu Leu Leu Glu Ala Ala Leu Asp His Asn Thr Ile Val Cys Leu  
50 55 60

Asn Thr Gly Ser Gly Lys Thr Phe Ile Ala Ser Thr Thr Leu Leu Lys  
65 70 75 80

Ser Cys Leu Tyr Leu Asp Leu Gly Glu Thr Ser Ala Arg Asn Gly Lys  
85 90 95

Arg Thr Val Phe Leu Val Asn Ser Ala Asn Gln Val Ala Gln Gln Val  
100 105 110

Ser Ala Val Arg Thr His Ser Asp Leu Lys Val Gly Glu Tyr Ser Asn  
115 120 125

Leu Glu Val Asn Ala Ser Trp Thr Lys Glu Arg Trp Asn Gln Glu Phe  
130 135 140

Thr Lys His Gln Val Leu Ile Met Thr Cys Tyr Val Ala Leu Asn Val  
145 150 155 160

Leu Lys Asn Gly Tyr Leu Ser Leu Ser Asp Ile Asn Leu Leu Val Phe  
165 170 175

Asp Glu Cys His Leu Ala Ile Leu Asp His Pro Tyr Arg Glu Phe Met  
180 185 190

Lys Leu Cys Glu Ile Cys Pro Ser Cys Pro Arg Ile Leu Gly Leu Thr  
195 200 205

Ala Ser Ile Leu Asn Gly Lys Trp Asp Pro Glu Asp Leu Glu Glu Lys  
210 215 220

Phe Gln Lys Leu Glu Lys Ile Leu Lys Ser Asn Ala Glu Thr Ala Thr  
225 230 235 240

Asp Leu Val Val Leu Asp Arg Tyr Thr Ser Gln Pro Cys Glu Ile Val  
245 250 255

Val Asp Cys Gly Pro Phe Thr Asp Arg Ser Gly Leu Tyr Glu Arg Leu  
260 265 270

Leu Met Glu Leu Glu Glu Ala Leu Asn Phe Ile Asn Asp Cys Asn Ile  
275 280 285

Ser Val His Ser Lys Glu Arg Asp Ser Thr Leu Ile Ser Lys Gln Ile  
290 295 300

Leu Ser Asp Cys Arg Ala Val Leu Val Val Leu Gly Pro Trp Cys Ala  
305 310 315 320

Asp Lys Val Ala Gly Met Met Val Arg Glu Leu Gln Lys Tyr Ile Lys  
325 330 335

His Glu Gln Glu Glu Leu His Arg Lys Phe Leu Leu Phe Thr Asp Thr  
340 345 350

Phe Leu Arg Lys Ile His Ala Leu Cys Glu Glu His Phe Ser Pro Ala  
355 360 365

Ser Leu Asp Leu Lys Phe Val Thr Pro Lys Val Ile Lys Leu Leu Glu  
370 375 380

Ile Leu Arg Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Arg His Ser Phe Glu Ser Val  
385 390 395 400

Glu Trp Tyr Asn Asn Arg Asn Gln Asp Asn Tyr Val Ser Trp Ser Asp  
405 410 415

Ser Glu Asp Asp Asp Glu Asp Glu Glu Ile Glu Glu Lys Glu Lys Pro  
420 425 430

Glu Thr Asn Phe Pro Ser Pro Phe Thr Asn Ile Leu Cys Gly Ile Ile  
435 440 445

Phe Val Glu Arg Arg Tyr Thr Ala Val Val Leu Asn Arg Leu Ile Lys  
450 455 460

Glu Ala Gly Lys Gln Asp Pro Glu Leu Ala Tyr Ile Ser Ser Asn Phe  
465 470 475 480

Ile Thr Gly His Gly Ile Gly Lys Asn Gln Pro Arg Asn Asn Thr Met  
485 490 495

Glu Ala Glu Phe Arg Lys Gln Glu Glu Val Leu Arg Lys Phe Arg Ala  
500 505 510

His Glu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Thr Ser Ile Val Glu Glu Gly Val  
515 520 525

Asp Ile Pro Lys Cys Asn Leu Val Val Arg Phe Asp Leu Pro Thr Glu  
530 535 540

Tyr Arg Ser Tyr Val Gln Ser Lys Gly Arg Ala Arg Ala Pro Ile Ser  
545 550 555 560

Asn Tyr Ile Met Leu Ala Asp Thr Asp Lys Ile Lys Ser Phe Glu Glu  
565 570 575

Asp Leu Lys Thr Tyr Lys Ala Ile Glu Lys Ile Leu Arg Asn Lys Cys  
580 585 590

Ser Lys Ser Val Asp Thr Gly Glu Thr Asp Ile Asp Pro Val Met Asp  
595 600 605

Asp Asp His Val Phe Pro Pro Tyr Val Leu Arg Pro Asp Asp Gly Gly  
610 615 620

Pro Arg Val Thr Ile Asn Thr Ala Ile Gly His Ile Asn Arg Tyr Cys  
625 630 635 640

Ala Arg Leu Pro Ser Asp Pro Phe Thr His Leu Ala Pro Lys Cys Arg  
645 650 655

Thr Arg Glu Leu Pro Asp Gly Thr Phe Tyr Ser Thr Leu Tyr Leu Pro  
660 665 670

Ile Asn Ser Pro Leu Arg Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys  
675 680 685

Val Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu  
690 695 700

His Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu  
705 710 715 720

Thr Val Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr  
725 730 735

Ser Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro  
740 745 750

Lys Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln  
755 760 765

Pro Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro  
770 775 780

Asp Glu Leu Asn Phe Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr  
785 790 795 800

Thr Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro  
805 810 815

His Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu  
820 825 830

Leu Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile  
835 840 845

Thr Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys  
850 855 860

Pro Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val  
865 870 875 880

Leu Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe  
885 890 895

Lys Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro  
900 905 910

Ser Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp  
915 920 925

Tyr Gln Asp Ala Val Ile Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro  
930 935 940

His Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser  
945 950 955 960

Lys Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr  
965 970 975

Lys Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val  
980 985 990

Asp His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn  
995 1000 1005

Gln Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys  
1010 1015 1020

Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu  
1025 1030 1035

Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala  
1040 1045 1050

Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr  
1055 1060 1065

Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly  
1070 1075 1080

Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe  
1085 1090 1095

Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser  
1100 1105 1110

Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr  
 1115 1120 1125

Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr Ser  
 1130 1135 1140

Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu  
 1145 1150 1155

Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp  
 1160 1165 1170

Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn  
 1175 1180 1185

Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln  
 1190 1195 1200

Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser  
 1205 1210 1215

Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro  
 1220 1225 1230

Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn  
 1235 1240 1245

Ala Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met  
 1250 1255 1260

Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp  
 1265 1270 1275

Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly  
 1280 1285 1290

Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala  
1295 1300 1305

Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser  
1310 1315 1320

Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro  
1325 1330 1335

Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val  
1340 1345 1350

Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro  
1355 1360 1365

Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp Leu  
1370 1375 1380

Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys  
1385 1390 1395

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly  
1400 1405 1410

Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser  
1415 1420 1425

Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp  
1430 1435 1440

Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met  
1445 1450 1455

Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro  
1460 1465 1470

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys  
1475 1480 1485

Ser Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe  
1490 1495 1500

Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys  
1505 1510 1515

Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser  
1520 1525 1530

Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr  
1535 1540 1545

Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp  
1550 1555 1560

Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu  
1565 1570 1575

Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu  
1580 1585 1590

Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr  
1595 1600 1605

Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser Cys  
1610 1615 1620

Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp  
1625 1630 1635

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp  
1640 1645 1650

His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe  
1655 1660 1665

Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala  
1670 1675 1680

Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr  
1685 1690 1695

Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile  
1700 1705 1710

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln  
1715 1720 1725

His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn  
1730 1735 1740

Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys  
1745 1750 1755

Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp  
1760 1765 1770

Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp  
1775 1780 1785

Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp  
1790 1795 1800

Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala  
1805 1810 1815

Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp  
1820 1825 1830

Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser  
1835 1840 1845

Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu  
1850 1855 1860

Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly  
1865 1870 1875

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys  
1880 1885 1890

Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg  
1895 1900 1905

Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn  
1910 1915 1920

Ser

<210> 2  
<211> 5772  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 2  
atgaaaagcc ctgctttgca acccctcagc atggcaggcc tgcagctcat gacccctgct 60  
tcctcaccaa tgggtccttt ctttggactg ccatggcaac aagaagcaat tcatgataac 120  
atttatacgc caagaaaata tcaggttgaa ctgcttgaag cagctctgga tcataatacc 180  
atcgtctgtt taaacactgg ctgagggaag acatttattg ctagtactac tctactaaag 240  
agctgtctct atctagatct aggggagact tcagctagaa atggaaaaag gacggtgttc 300  
ttggtcaact ctgcaaacca ggttgctcaa caagtgtcag ctgtcagaac tcattcagat 360  
ctcaaggttg gggaatactc aaacctagaa gtaaatgcat cttggacaaa agagagatgg 420  
aaccaagagt ttactaagca ccaggttctc attatgactt gctatgtcgc cttgaatgtt 480  
ttgaaaaatg gttacttatt actgtcagac attaaccttt tgggtgttga tgagtgtcat 540  
cttgcaatcc tagaccaccc ctatcgagaa tttatgaagc tctgtgaaat ttgtccatca 600  
tgtcctcgca ttttgggact aactgcttcc attttaaatg ggaaatggga tccagaggat 660

ttggaagaaa agtttcagaa actagagaaa attcttaaga gtaatgctga aactgcaact 720  
gacctggtgg tcttagacag gtatacttct cagccatgtg agattgtggt ggattgtgga 780  
ccatttactg acagaagtgg gctttatgaa agactgctga tggaattaga agaagcactt 840  
aattttatca atgattgtaa tatatctgta cattcaaaag aaagagattc tactttaatt 900  
tcgaaacaga tactatcaga ctgtcgtgcc gtattggtag ttctgggacc ctggtgtgca 960  
gataaagtag ctggaatgat ggtaagagaa ctacagaaat acatcaaaca tgagcaagag 1020  
gagctgcaca ggaaattttt attgtttaca gacacittcc taaggaaaat acatgcacta 1080  
tgtgaagagc acttctcacc tgcctcactt gacctgaaat ttgtaactcc taaagtaatc 1140  
aaactgctcg aaatcttacg caaatataaa ccatatgagc gacacagttt tgaaagcgtt 1200  
gagtgggtata ataatagaaa tcaggataat tatgtgtcat ggagtgattc tgaggatgat 1260  
gatgaggatg aagaaattga agaaaaagag aagccagaga caaatittcc ttctcctttt 1320  
accaacattt tgtgcggaat tatttttgtg gaaagaagat acacagcagt tgtcttaaac 1380  
agattgataa aggaagctgg caaacaagat ccagagctgg cttatatcag tagcaatttc 1440  
ataactggac atggcattgg gaagaatcag cctcgcaaca acacgatgga agcagaattc 1500  
agaaaacagg aagaggtact taggaaatit cgagcacatg agaccaacct gcttattgca 1560  
acaagtattg tagaagaggg tgttgatata ccaaaatgca acttgggtggg tcgttttggat 1620  
ttgccacag aatatcgatc ctatgttcaa tctaaaggaa gagcaagggc acccatctct 1680  
aattatataa tgttagcgga tacagacaaa ataaaaagtt ttgaagaaga ccttaaaacc 1740  
tacaaagcta ttgaaaagat cttgagaaac aagtgttcca agtcggttga tactggtgag 1800  
actgacattg atcctgtcat ggatgatgat cacgttttcc caccatatgt gttgaggcct 1860  
gacgatggtg gtccacgagt cacaatcaac acggccattg gacacatcaa tagatactgt 1920  
gctagattac caagtgatcc gtttactcat ctagctccta aatgcagaac ccgagagttg 1980  
cctgatggta catittattc aactctttat ctgccaatta actcacctct tcgagcctcc 2040  
attgttggtc caccaatgag ctgtgtacga ttggctgaaa gagttgtcgc tctcatttgc 2100  
tgtgagaaac tgcacaaaat tggcgaactg gatgaccatt tgatgccagt tgggaaagag 2160

actgttaa atgaagagga gcttgatttg catgatgaag aagagaccag tgttccagga 2220  
agaccagggt ccacgaaacg aaggcagtg tacccaaaag caattccaga gtgtttgagg 2280  
gatagttatc ccagacctga tcagccctgt tacctgtatg tgataggaat ggttttaact 2340  
acacctttac ctgatgaact caactttaga aggcggaagc tctatcctcc tgaagatacc 2400  
acaagatgct ttggaatact gacggccaaa ccatacctc agattccaca ctttcctgtg 2460  
tacacacgct ctggagaggt taccatatcc attgagttga agaagtctgg tttcatgttg 2520  
tctctacaaa tgcttgagtt gattacaaga cttcaccagt atatatctc acatattctt 2580  
cggcttgaaa aacctgcact agaatttaaa cctacagacg ctgattcagc atactgtgtt 2640  
ctaccttta atgttgttaa tgactccagc actttggata ttgactttaa attcatggaa 2700  
gatattgaga agtctgaagc tcgcataggc attcccagta caaagtatac aaaagaaaca 2760  
ccctttgttt ttaaattaga agattaccaa gatgccgtta tcattccaag atatcgcaat 2820  
tttgatcagc ctcatcgatt ttatgtagct gatgtgtaca ctgatcttac ccactcagt 2880  
aaatttcctt cccctgagta tgaaactttt gcagaatatt ataaaacaaa gtacaacctt 2940  
gacctaacca atctcaacca gccactgctg gatgtggacc acacatcttc aagacttaat 3000  
cttttgacac ctcgacattt gaatcagaag gggaaagcgc ttcctttaag cagtgtgag 3060  
aagaggaaag ccaaattgga aagtctgcag aataaacaga tactggttcc agaactctgt 3120  
gtatacatc caattccagc atcactgtgg agaaaagctg tttgtctccc cagcatactt 3180  
tatgccttc actgcctttt gactgcagag gagctaagag ccagactgc cagcgatgct 3240  
ggcgtgggag tcagatcact tcctgcggat ttagatacc ctaacttaga cttcgggtgg 3300  
aaaaatcta ttgacagcaa atctttcatc tcaatttcta actcctcttc agctgaaaat 3360  
gataattact gtaagcacag cacaattgtc cctgaaaatg ctgcacatca aggtgcta at 3420  
agaacctcct ctctagaaaa tcatgaccaa atgtctgtga actgcagaac gttgctcagc 3480  
gagtccttg gtaagctcca cgttgaagtt tcagcagatc ttacagcaat taatggtctt 3540  
tcttacaatc aaaatctgc caatggcagt tatgatttag ctaacagaga cttttgcca 3600  
ggaaatcagc taaattacta caagcaggaa ataccgtgc aaccaactac ctcatattcc 3660

attcagaatt tatacagtta cgagaaccag cccagccca gcatgaatg tactctcctg 3720  
agtaataaat acctgatgg aaatgctaac aaatctacct cagatggaag tcctgtgatg 3780  
gccgtaatgc ctggtacgac agacactiatt caagtgtca agggcaggat ggattctgag 3840  
cagagccctt ctattgggta ctctcaagg actcttggcc ccaatcctgg acttattctt 3900  
caggctttga ctctgtcaaa cgctagtgat ggatttaacc tggagcggct tgaaatgctt 3960  
ggcgactcct ttttaaagca tgccatcacc acatatctat ttgacctta ccctgatgcg 4020  
catgagggcc gcctttcata tatgagaagc aaaaagggtca gcaactgtaa tctgtatcgc 4080  
cttggaaaaa agaagggact acccagccgc atggtggtgt caatatttga tccccctgtg 4140  
aattggcttc ctctgggta ttagtaaat caagacaaaa gcaacacaga taaatgggaa 4200  
aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcatgctg gcgaatggca aactggatga ggattacgag 4260  
gaggaggatg aggaggagga gagcctgatg tggagggtc cgaaggaaga ggctgactat 4320  
gaagatgatt tcctggagta tgatcaggaa catatcagat ttatagataa tatgttaatg 4380  
gggtcaggag cttttgtaaa gaaaatctct ctttctcctt ttcaaccac tgattctgca 4440  
tatgaatgga aaatgcccaa aaaatcctcc ttaggtagta tgccattttc atcagatttt 4500  
gaggattttg actacagctc ttgggatgca atgtgctatc tggatcctag caaagctgtt 4560  
gaagaagatg actttgtggt ggggttctgg aatccatcag aagaaaactg tgggtgtgac 4620  
acgggaaagc agtccatttc ttacgacttg cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc 4680  
atagcggact gtgtggaagc cctgctgggc tgctatttaa ccagctgtgg ggagagggt 4740  
gctcagcttt tcctctgttc actggggctg aaggtgctcc cggttaattaa aaggactgat 4800  
cgggaaaagg ccctgtgccc tactcgggag aatttcaaca gccaacaaaa gaacctttca 4860  
gtgagctgtg ctgctgcttc tgtggccagt tcacgctctt ctgtattgaa agactcggaa 4920  
tatggttggt tgaagattcc accaagatgt atgtttgatc atccagatgc agataaaaca 4980  
ctgaatcacc ttatatcggg gtttgaaaat ttgaaaaga aaatcaacta cagattcaag 5040  
aataaggctt accttctcca ggcttttaca catgcctcct accactacaa tactatcact 5100  
gattgttacc agcgcttaga attcctggga gatgcgattt tggactacct cataaccaag 5160

cacctttatg aagacccgcg gcagcactcc ccgggggtcc tgacagacct gcggtctgcc 5220  
ctggtcaaca acaccatctt tgcctcgtg gctgtaaagt acgactacca caagtacttc 5280  
aaagctgtct ctctgagct cticcatgtc attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag 5340  
aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa 5400  
gaagaggata ttgaagttcc aaaggccatg ggggatattt ttgagtcgct tgctggtgcc 5460  
atttacctgg atagtgggat gtcactggag acagtctggc aggtgtacta tcccatgatg 5520  
cggccactaa tagaaaagt ttctgcaaat gtaccccggt cccctgtgcg agaattgctt 5580  
gaaatggaac cagaaactgc caaattagc ccggctgaga gaacttacga cgggaaggtc 5640  
agagtcactg tggaagtagt aggaaagggg aaatttaaag gtgttggtcg aagttacagg 5700  
attgccaaat ctgcagcagc aagaagagcc ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag 5760  
gttcccaata gc 5772

<210> 3

<211> 1962

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 3

caagtgtca agggcaggat ggattctgag cagagccctt ctattgggta ctctcaagg 60  
actcttgcc ccaatcctgg acttattctt caggcttga ctctgtcaaa cgctagtgat 120  
ggatttaacc tggagcggct tgaaatgctt ggcgactcct ttttaaagca tgccatcacc 180  
acatatctat ttgcaactta ccctgatgcg catgaggggc gcctttcata tatgagaagc 240  
aaaaagggtca gcaactgtaa tctgtatcg cttggaaaaa agaagggact acccagccgc 300  
atggttggtgt caatatitga tccccctgtg aattggcttc ctcttggtta ttagtaaat 360  
caagacaaaa gcaacacaga taaatgggaa aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcatgctg 420  
gcgaatggca aactggatga ggattacgag gaggaggatg aggaggagga gagcctgatg 480  
tggagggctc cgaaggaaga ggctgactat gaagatgatt tcctggagta tgatcaggaa 540

catatcagat ttatagataa tatgttaatg gggtcaggag cttttgtaaa gaaaatctct 600  
ctttctcctt tttcaaccac tgattctgca tatgaatgga aaatgcccaa aaaatcctcc 660  
ttaggtagta tgccattttc atcagatttt gaggattttg actacagctc ttgggatgca 720  
atgtgctatc tggatcctag caaagctgtt gaagaagatg actttgtggt ggggttctgg 780  
aatccatcag aagaaaactg tgggtgtgac acgggaaagc agtccatttc ttacgacttg 840  
cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc atagcggact gtgtggaagc cctgctgggc 900  
tgctatttaa ccagctgtgg ggagagggct gctcagcttt tcctctgttc actggggctg 960  
aaggtgctcc cggtaattaa aaggactgat cgggaaaagg ccctgtgccc tactcgggag 1020  
aatttcaaca gccaaacaaa gaacctttca gtgagctgtg ctgctgcttc tgtggccagt 1080  
tcacgctctt ctgtattgaa agactcggaa tatggttgtt tgaagattcc accaagatgt 1140  
atgtttgatc atccagatgc agataaaaca ctgaatcacc ttatatcggg gtttgaaaat 1200  
tttgaaaaga aaatcaacta cagattcaag aataaggctt accttctcca ggcttttaca 1260  
catgcctcct accactacaa tactatcact gattgttacc agcgcttaga attcctggga 1320  
gatgcgattt tggactacct cataaccaag cacctttatg aagacccgcg gcagcactcc 1380  
ccgggggtcc tgacagacct gcggtctgcc ctggtcaaca acaccatctt tgcacgctg 1440  
gctgtaaagt acgactacca caagtacttc aaagctgtct ctctgagct cttccatgtc 1500  
attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag 1560  
cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa gaagaggata ttgaagtcc aaaggccatg 1620  
ggggatattt ttgagtcgct tgctgggtgcc atttacctgg atagtgggat gtcactggag 1680  
acagcttggc aggtgtacta tcccatgatg cggccactaa tagaaaagtt ttctgcaaat 1740  
gtaccccggt cccctgtgcg agaattgctt gaaatggaac cagaaactgc caaatttagc 1800  
ccggctgaga gaacttacga cgggaaggct agagtcactg tggaagtagt aggaaagggg 1860  
aaatttaaag gtgttggtcg aagttacagg attgccaat ctgcagcagc aagaagagcc 1920  
ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag gttccaata gc 1962

<211> 654  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant.

<400> 4

Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly  
 1 5 10 15

Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala  
 20 25 30

Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu  
 35 40 45

Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe  
 50 55 60

Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser  
 65 70 75 80

Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly  
 85 90 95

Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp  
 100 105 110

Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys  
 115 120 125

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly Lys  
 130 135 140

Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser Leu Met  
 145 150 155 160

Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp Phe Leu Glu

165

170

175

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser  
180 185 190

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp  
195 200 205

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met  
210 215 220

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala  
225 230 235 240

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val  
245 250 255

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly  
260 265 270

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp  
275 280 285

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr  
290 295 300

Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu  
305 310 315 320

Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys  
325 330 335

Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser  
340 345 350

Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp  
355 360 365

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His  
370 375 380

Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn  
385 390 395 400

Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu  
405 410 415

Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys  
420 425 430

Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile  
435 440 445

Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu  
450 455 460

Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu  
465 470 475 480

Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu  
485 490 495

Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn  
500 505 510

Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu  
515 520 525

Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe  
530 535 540

Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu  
545 550 555 560

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys

565

570

575

Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met  
580 585 590

Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly  
595 600 605

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly  
610 615 620

Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala  
625 630 635 640

Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser  
645 650

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer

<400> 5

tcgagctcgg tacccaagt gctcaagggc aggatg

36

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer

<400> 6

tatctagaaa gcttttagct attgggaacc tgaggt

36

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 7

gggtaatacg actcactata gggagaatgg ctagcaaagg ag

42

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 8

gggtaatacg actcactata gggagatcag ttgtacagtt ca

42

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> Thermotoga maritima

<400> 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Gly | Lys | Val | Lys | Trp | Phe | Asp | Ser | Lys | Lys | Gly | Tyr | Gly | Phe |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Thr | Lys | Asp | Glu | Gly | Gly | Asp | Val | Phe | Val | His | Trp | Ser | Ala | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Met | Glu | Gly | Phe | Lys | Thr | Leu | Lys | Glu | Gly | Gln | Val | Val | Glu | Phe |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ile | Gln | Glu | Gly | Lys | Lys | Gly | Pro | Gln | Ala | Ala | His | Val | Lys | Val |
|     |     |     | 50  |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |
|-----|-----|
| Val | Glu |
| 65  |     |

<210> 10  
<211> 198  
<212> DNA  
<213> *Thermotoga maritima*

<400> 10  
atgagaggaa aggttaagtg gttcgattcc aagaagggt acggattcat cacaaggac 60  
gaaggaggag acgtgttcgt acactgggtca gccatcgaaa tggaaggttt caaaactctg 120  
aaggaaggcc aggtcgtcga gttcgagatt caggaaggca agaaagggtcc acaggcagcg 180  
cacgtgaaag tagttgag 198

<210> 11  
<211> 720  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> A gene encoding red-shifted green fluorescence protein.

<400> 11  
atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 60  
ggtgatgta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaagggtga tgcaacatac 120  
ggaaaactta ccctgaagtt catctgcact actggcaaac tgcctgttcc atggccaaca 180  
ctagtacta ctctgtgcta tgggtgttcaa tgcttttcaa gatacccgga tcatatgaaa 240  
cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc 300  
ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 360  
gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggaaacat tctgggacac 420  
aaattggaat acaactataa ctacacacat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat 480  
ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca 540  
gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 600  
tacctgtcca cacaatctgc cttttcgaag gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660  
cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaactga 720

<210> 12

<211> 675  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 12

Met Asn His Lys Val His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn  
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln  
 20 25 30

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly  
 35 40 45

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn  
 50 55 60

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile  
 65 70 75 80

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu  
 85 90 95

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu  
 100 105 110

Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp  
 115 120 125

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys  
 130 135 140

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met  
 145 150 155 160

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu

165

170

175

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn  
195 200 205

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro  
210 215 220

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser  
225 230 235 240

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr  
245 250 255

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu  
260 265 270

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys  
275 280 285

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu  
290 295 300

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu  
305 310 315 320

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu  
325 330 335

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg  
340 345 350

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys  
355 360 365

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser  
 370 375 380

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg  
 385 390 395 400

Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile  
 405 410 415

Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn  
 420 425 430

Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn  
 435 440 445

Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile  
 450 455 460

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His  
 465 470 475 480

Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr  
 485 490 495

Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys  
 500 505 510

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe  
 515 520 525

Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg  
 530 535 540

Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala  
 545 550 555 560

Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser

565

570

575

Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg  
580 585 590

Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg  
595 600 605

Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu  
610 615 620

Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys  
625 630 635 640

Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala  
645 650 655

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val  
660 665 670

Pro Asn Ser  
675

<210> 13  
<211> 2025  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 13  
atgaatcaca aagtgcacatca tcatcatcat catatcgaag gtaggaattc gagctcggta 60  
ccccaagtgc tcaagggcag gatggattct gagcagagcc cttctattgg gtactcctca 120  
aggactcttg gccccaatcc tggacttatt cttcaggctt tgactctgtc aaacgctagt 180  
gatggattta acctggagcg gcttgaaatg cttggcgact cttttttaaa gcatgccatc 240  
accacatata tattttgcac ttaccctgat gcgcatgagg gccgcctttc atatatgaga 300

agcaaaaagg tcagcaactg taatctgtat cgccttggaa aaaagaaggg actaccacgc 360  
cgcatggtgg tgtcaatatt tgatccccct gtgaattggc ttcctcctgg ttatgtagta 420  
aatcaagaca aaagcaacac agataaatgg gaaaaagatg aaatgacaaa agactgcatg 480  
ctggcgaatg gcaaactgga tgaggattac gaggaggagg atgaggagga ggagagcctg 540  
atgtggaggg ctccgaagga agaggctgac tatgaagatg atttcctgga gtatgatcag 600  
gaacatatca gatttataga taatatgtta atggggtcag gagcttttgt aaagaaaatc 660  
tctctttctc ctttttcaac cactgattct gcatatgaat ggaaaatgcc caaaaaatcc 720  
tccttaggta gtatgccatt ttcacagat tttgaggatt ttgactacag ctcttgggat 780  
gcaatgtgct atctggatcc tagcaaagct gttgaagaag atgactttgt ggtgggggtc 840  
tggaatccat cagaagaaaa ctgtggtgtt gacacgggaa agcagtccat ttcttacgac 900  
ttgcacactg agcagtgtat tgctgacaaa agcatagcgg actgtgtgga agccctgctg 960  
ggctgctatt taaccagctg tggggagagg gctgctcagc ttttcctctg ttcactgggg 1020  
ctgaagggtgc tcccggtaat taaaaggact gatcgggaaa aggccctgtg ccctactcgg 1080  
gagaatttca acagccaaca aaagaacctt tcagtgagct gtgctgctgc ttctgtggcc 1140  
agttcacgct cttctgtatt gaaagactcg gaatatggtt gtttgaagat tccaccaaga 1200  
tgtatgtttg atcatccaga tgcagataaa aactgaatc accttatatc ggggtttgaa 1260  
aattttgaaa agaaaatcaa ctacagattc aagaataagg cttaccttct ccaggctttt 1320  
acacatgcct cctaccacta caatactatc actgattgtt accagcgctt agaattcctg 1380  
ggagatgcga ttttggacta cctcataacc aagcaccttt atgaagaccc gcggcagcac 1440  
tccccggggg tcctgacaga cctgcggtct gccctgggtca acaacaccat ctttgcacg 1500  
ctggctgtaa agtacgacta ccacaagtac ttcaaagctg tctctcctga gctcttccat 1560  
gtcattgatg actttgtgca gtttcagctt gagaagaatg aaatgcaagg aatggattct 1620  
gagcttagga gatctgagga ggatgaagag aaagaagagg atattgaagt tccaaaggcc 1680  
atgggggata tttttgagtc gcttgctggt gccatttaca tggatagtgg gatgtcactg 1740  
gagacagtct ggcagggtga ctatcccatg atgcggccac taatagaaaa gttttctgca 1800

aatgtacccc gttcccctgt gcgagaattg cttgaaatgg aaccagaaac tgccaaattt 1860  
agcccggctg agagaactta cgacgggaag gtcagagtca ctgtggaagt agtaggaaag 1920  
gggaaattta aagggtgttg tcgaagttac aggattgcca aatctgcagc agcaagaaga 1980  
gccctccgaa gcctcaaagc taatcaacct caggttccca atagc 2025

<210> 14  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic primer 5 to amplify a gene encoding human dicer mutant

<400> 14  
tcgagctcgg taccgcctc cattgttggc ccacca 36

<210> 15  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic primer 6 to amplify a gene encoding human dicer mutant

<400> 15  
tatctagaaa gcttttagct attgggaacc tgaggt 36

<210> 16  
<211> 3741  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 16  
gcctccattg ttggtccacc aatgagctgt gtacgattgg ctgaaagagt tgtcgctctc 60  
atttgctgtg agaaactgca caaaattggc gaactggatg accatttgat gccagttggg 120  
aaagagactg ttaaatatga agaggagctt gatttgcatt atgaagaaga gaccagtgtt 180  
ccaggaagac caggttccac gaaacgaagg cagtgtctacc caaaagcaat tccagagtgt 240  
ttgagggata gttatcccag acctgatcag ccctgttacc tgtatgtgat aggaatgggt 300

ttaactacac ctttacctga tgaactcaac tttagaaggc ggaagctcta tcctcctgaa 360  
gataaccacaa gatgctttgg aatactgacg gccaaaccca tacctcagat tccacacttt 420  
cctgtgtaca cacgctctgg agaggttacc atatccattg agttgaagaa gtctggtttc 480  
atgttgtctc taaaaatgct tgagttgatt acaagacttc accagtatat attctcacat 540  
attcttcggc ttgaaaaacc tgcactagaa tttaaacctc cagacgctga ttcagcatac 600  
tgtgttctac ctcttaatgt tgttaatgac tccagcactt tggatattga ctttaaattc 660  
atggaagata ttgagaagtc tgaagctcgc ataggcattc ccagtacaaa gtatacaaaa 720  
gaaacaccct ttgtttttta attagaagat taccaagatg ccgttatcat tccaagatat 780  
cgcaattttg atcagcctca tcgattttat gtagctgatg tgtacactga tcttacccca 840  
ctcagtaa at ttccttcccc tgagtatgaa acttttgcag aatattataa aacaaagtac 900  
aaccttgacc taaccaatct caaccagcca ctgctggatg tggaccacac atcttcaaga 960  
cttaatcttt tgacacctcg acatttgaat cagaagggga aagcgcttcc tttaagcagt 1020  
gctgagaaga ggaaagccaa atgggaaagt ctgcagaata aacagatact gggtccagaa 1080  
ctctgtgcta tacatccaat tccagcatca ctgtggagaa aagctgtttg tctccccagc 1140  
atactttatc gccttactg ctttttgact gcagaggagc taagagccca gactgccagc 1200  
gatgctggcg tgggagtcag atcacttcct gcggatttta gataccctaa cttagacttc 1260  
gggtggaaaa aatctattga cagcaa atct ttcactca tttctaactc ctcttcagct 1320  
gaaaatgata attactgtaa gcacagcaca attgtccctg aaaatgctgc acatcaaggt 1380  
gctaatagaa cctcctctct agaaaatcat gaccaa atgt ctgtgaactg cagaacgttg 1440  
ctcagcgagt cccctggtaa gctccacgtt gaagtttcag cagatcttac agcaattaat 1500  
gggtctttctt acaatcaaaa tctcgccaat ggcagttatg atttagctaa cagagacttt 1560  
tgccaaggaa atcagctaaa ttactacaag caggaa atac ccgtgcaacc aactacctca 1620  
tattccattc agaatttata cagttacgag aaccagcccc agcccagcga tgaatgtact 1680  
ctcctgagta ataaataacct tgatggaaat gctaacaa at ctacctcaga tggaagtcct 1740  
gtgatggccg taatgcctgg tacgacagac actattcaag tgctcaaggg caggatggat 1800

tctgagcaga gcccttctat tgggtactcc tcaaggactc ttggcccca aa tcctggactt 1860  
attcttcagg ctttgactct gtcaaacgct agtgatggat ttaacctgga gcggcttgaa 1920  
atgcttggcg actccttttt aaagcatgcc atcaccacat atctattttg cacttacct 1980  
gatgcgcatg agggccgcct ttcatatatg agaagcaaaa aggtcagcaa ctgtaatctg 2040  
tatgccttg gaaaaaagaa gggactaccc agccgcatgg tgggtgcaat atttgatccc 2100  
cctgtgaatt ggcttctcc tggttatgta gtaaataag acaaaagcaa cacagataaa 2160  
tgggaaaaag atgaaatgac aaaagactgc atgctggcga atggcaaact ggatgaggat 2220  
tacgaggagg aggatgagga ggaggagagc ctgatgtgga gggctccgaa ggaagaggct 2280  
gactatgaag atgatttcct ggagtatgat caggaacata tcagatttat agataatatg 2340  
ttaatgggggt caggagcttt tgtaaagaaa atctctcttt ctcttttttc aaccactgat 2400  
tctgcatatg aatggaaaat gcccaaaaaa tcctccttag gtagtatgcc attttcatca 2460  
gattttgagg attttgacta cagctcttgg gatgcaatgt gctatctgga tcctagcaaa 2520  
gctgttgaag aagatgactt tgtggtgggg ttctggaatc catcagaaga aaactgtggt 2580  
gttgacacgg gaaagcagtc catttcttac gacttgaca ctgagcagtg tattgctgac 2640  
aaaagcatag cggactgtgt ggaagccctg ctgggctgct atttaaccag ctgtggggag 2700  
agggtgctc agcttttcct ctgttactg gggctgaagg tgctcccggt aattaaaagg 2760  
actgatcggg aaaaggccct gtgccctact cgggagaatt tcaacagcca acaaaagaac 2820  
ctttcagtga gctgtgctgc tgcttctgtg gccagttcac gctcttctgt attgaaagac 2880  
tcggaatatg gttgtttgaa gattccacca agatgtatgt ttgatcatcc agatgcagat 2940  
aaaacactga atcaccttat atcgggggtt gaaaattttg aaaagaaaat caactacaga 3000  
ttcaagaata aggttacct tctccaggct ttacacatg cctcctacca ctacaatact 3060  
atcactgatt gttaccagcg cttagaattc ctgggagatg cgattttgga ctacctcata 3120  
accaagcacc tttatgaaga cccgcggcag cactccccgg gggtcctgac agacctgcgg 3180  
tctgccctgg tcaacaacac catctttgca tcgctggctg taaagtacga ctaccacaag 3240  
tacttcaaag ctgtctctcc tgagctcttc catgtcattg atgactttgt gcagtttcag 3300

ctigagaaga atgaaatgca aggaatggat tctgagctta ggagatctga ggaggatgaa 3360  
 gagaaagaag aggatattga agttccaaag gccatggggg atatttttga gtcgcttgct 3420  
 ggtgccattt acatggatag tgggatgtca ctggagacag tctggcaggt gtactatccc 3480  
 atgatgcggc cactaataga aaagttttct gcaaatgtac cccgttcccc tgtgcgagaa 3540  
 ttgcttgaag tggaaccaga aactgccaaa tttagcccgg ctgagagAAC ttacgacggg 3600  
 aaggtcagag tcaactgtga agtagtagga aaggggaaat ttaaaggtgt tggtcgaagt 3660  
 tacaggattg ccaaactctgc agcagcaaga agagccctcc gaagcctcaa agctaataa 3720  
 cctcaggttc ccaatagcta a 3741

<210> 17  
 <211> 1246  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 17

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ser | Ile | Val | Gly | Pro | Pro | Met | Ser | Cys | Val | Arg | Leu | Ala | Glu | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Val | Ala | Leu | Ile | Cys | Cys | Glu | Lys | Leu | His | Lys | Ile | Gly | Glu | Leu |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Asp | His | Leu | Met | Pro | Val | Gly | Lys | Glu | Thr | Val | Lys | Tyr | Glu | Glu |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Leu | Asp | Leu | His | Asp | Glu | Glu | Glu | Thr | Ser | Val | Pro | Gly | Arg | Pro |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Thr | Lys | Arg | Arg | Gln | Cys | Tyr | Pro | Lys | Ala | Ile | Pro | Glu | Cys |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Arg | Asp | Ser | Tyr | Pro | Arg | Pro | Asp | Gln | Pro | Cys | Tyr | Leu | Tyr | Val |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |

Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro Asp Glu Leu Asn Phe Arg  
100 105 110

Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr Thr Arg Cys Phe Gly Ile  
115 120 125

Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro His Phe Pro Val Tyr Thr  
130 135 140

Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu Leu Lys Lys Ser Gly Phe  
145 150 155 160

Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile Thr Arg Leu His Gln Tyr  
165 170 175

Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys Pro Ala Leu Glu Phe Lys  
180 185 190

Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val Leu Pro Leu Asn Val Val  
195 200 205

Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe Lys Phe Met Glu Asp Ile  
210 215 220

Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro Ser Thr Lys Tyr Thr Lys  
225 230 235 240

Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp Tyr Gln Asp Ala Val Ile  
245 250 255

Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro His Arg Phe Tyr Val Ala  
260 265 270

Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser Lys Phe Pro Ser Pro Glu  
275 280 285

Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr Lys Tyr Asn Leu Asp Leu  
290 295 300

Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val Asp His Thr Ser Ser Arg  
305 310 315 320

Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn Gln Lys Gly Lys Ala Leu  
325 330 335

Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln  
340 345 350

Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro  
355 360 365

Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg  
370 375 380

Leu His Cys Leu Leu Thr Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser  
385 390 395 400

Asp Ala Gly Val Gly Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro  
405 410 415

Asn Leu Asp Phe Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile  
420 425 430

Ser Ile Ser Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His  
435 440 445

Ser Thr Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr  
450 455 460

Ser Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu  
465 470 475 480

Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp Leu  
485 490 495

Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn Gly Ser  
500 505 510

Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln Leu Asn Tyr  
515 520 525

Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser Tyr Ser Ile Gln  
530 535 540

Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro Ser Asp Glu Cys Thr  
545 550 555 560

Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn Ala Asn Lys Ser Thr Ser  
565 570 575

Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile  
580 585 590

Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly  
595 600 605

Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala  
610 615 620

Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu  
625 630 635 640

Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe  
645 650 655

Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser  
660 665 670

Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly  
675 680 685

Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp  
 690 695 700

Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys  
 705 710 715 720

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly Lys  
 725 730 735

Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser Leu Met  
 740 745 750

Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp Phe Leu Glu  
 755 760 765

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser  
 770 775 780

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp  
 785 790 795 800

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met  
 805 810 815

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala  
 820 825 830

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val  
 835 840 845

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly  
 850 855 860

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp  
 865 870 875 880

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr  
 885 890 895

Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu  
900 905 910

Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys  
915 920 925

Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser  
930 935 940

Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp  
945 950 955 960

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His  
965 970 975

Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn  
980 985 990

Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu  
995 1000 1005

Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp  
1010 1015 1020

Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr  
1025 1030 1035

Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro  
1040 1045 1050

Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile  
1055 1060 1065

Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys  
1070 1075 1080

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln  
1085 1090 1095

Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu  
1100 1105 1110

Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val  
1115 1120 1125

Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile  
1130 1135 1140

Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr  
1145 1150 1155

Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val  
1160 1165 1170

Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr  
1175 1180 1185

Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg  
1190 1195 1200

Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly  
1205 1210 1215

Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala Leu  
1220 1225 1230

Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser  
1235 1240 1245

<210> 18  
<211> 1267  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 18

Met Asn His Lys Val His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn  
1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys Val  
20 25 30

Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu His  
35 40 45

Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu Thr  
50 55 60

Val Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr Ser  
65 70 75 80

Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro Lys  
85 90 95

Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln Pro  
100 105 110

Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro Asp  
115 120 125

Glu Leu Asn Phe Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr Thr  
130 135 140

Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro His  
145 150 155 160

Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu Leu  
165 170 175

Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile Thr  
180 185 190

Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys Pro  
195 200 205

Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val Leu  
210 215 220

Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe Lys  
225 230 235 240

Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro Ser  
245 250 255

Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp Tyr  
260 265 270

Gln Asp Ala Val Ile Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro His  
275 280 285

Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser Lys  
290 295 300

Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr Lys  
305 310 315 320

Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val Asp  
325 330 335

His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn Gln  
340 345 350

Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys Ala Lys  
355 360 365

Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu Leu Cys Ala  
370 375 380

Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala Val Cys Leu Pro  
385 390 395 400

Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr Ala Glu Glu Leu Arg  
405 410 415

Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly Val Arg Ser Leu Pro Ala  
420 425 430

Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp  
435 440 445

Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp  
450 455 460

Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln  
465 470 475 480

Gly Ala Asn Arg Thr Ser Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val  
485 490 495

Asn Cys Arg Thr Leu Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu  
500 505 510

Val Ser Ala Asp Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn  
515 520 525

Leu Ala Asn Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly  
530 535 540

Asn Gln Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr  
545 550 555 560

Ser Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro  
565 570 575

Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn Ala  
580 585 590

Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met Pro Gly  
595 600 605

Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln  
610 615 620

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly  
625 630 635 640

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn  
645 650 655

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile  
660 665 670

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu  
675 680 685

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu  
690 695 700

Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp  
705 710 715 720

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys  
725 730 735

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met  
740 745 750

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
755 760 765

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu  
770 775 780

Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn  
785 790 795 800

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro  
805 810 815

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser  
820 825 830

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr  
835 840 845

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu  
850 855 860

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys  
865 870 875 880

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu  
885 890 895

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu  
900 905 910

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu  
915 920 925

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg  
930 935 940

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys  
945 950 955 960

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser  
965 970 975

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg  
980 985 990

Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile  
995 1000 1005

Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys  
1010 1015 1020

Asn Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His  
1025 1030 1035

Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly  
1040 1045 1050

Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp  
1055 1060 1065

Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala  
1070 1075 1080

Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp  
1085 1090 1095

Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val  
1100 1105 1110

Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln  
1115 1120 1125

Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys  
1130 1135 1140

Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu  
1145 1150 1155

Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu  
1160 1165 1170

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu  
1175 1180 1185

Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu  
1190 1195 1200

Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr  
1205 1210 1215

Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly  
1220 1225 1230

Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala  
1235 1240 1245

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln  
1250 1255 1260

Val Pro Asn Ser  
1265

<210> 19  
<211> 3804  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 19  
atgaatcaca aagtgcata tcatcatcat catatcgaag gtaggaattc gagctcggta 60  
ccgcctcca ttgttggtcc accaatgagc tgtgtacgat tggctgaaag agttgtcgct 120  
ctcatttgct gtgagaaact gcacaaaatt ggcgaactgg atgaccattt gatgccagtt 180  
gggaaagaga ctgttaaata tgaagaggag cttgatttgc atgatgaaga agagaccagt 240  
gttccaggaa gaccagggtc cacgaaacga aggcaagtgt acccaaaagc aattccagag 300  
tgtttgaggg atagtatatcc cagacctgat cagccctgtt acctgtatgt gataggaatg 360  
gttttaacta cacctttacc tgatgaactc aactttagaa ggcggaagct ctatcctcct 420

gaagatacca caagatgctt tggaatactg acggccaaac ccataacctca gattccacac 480  
tttcctgtgt acacacgctc tggagagggt accatatcca ttgagttgaa gaagtctggt 540  
ttcatgttgt ctctacaaat gcttgagttg attacaagac ttcaccagta tatattctca 600  
catattcttc ggcttgaaaa acctgcacta gaatttaaac ctacagacgc tgattcagca 660  
tactgtgttc tacctcttaa tgttgtaaat gactccagca ctttggatat tgacittaaa 720  
ttcatggaag atattgagaa gtctgaagct cgcataggca ttcccagtac aaagtataca 780  
aaagaaacac cctttgtttt taaattagaa gattaccaag atgccgttat cattccaaga 840  
tatcgcaatt ttgatcagcc tcatcgattt tatgtagctg atgtgtacac tgatcttacc 900  
ccactcagta aatttccttc ccctgagtat gaaacttttg cagaatatta taaaacaaag 960  
tacaaccttg acctaaccaa tctcaaccag ccactgctgg atgtggacca cacatcttca 1020  
agacttaatc ttttgacacc tcgacatttg aatcagaagg ggaaagcgct tcctttaagc 1080  
agtgtgaga agaggaaagc caaatgggaa agtctgcaga ataaacagat actggttcca 1140  
gaactctgtg ctatacatcc aattccagca tctactgtgga gaaaagctgt ttgtctcccc 1200  
agcatacttt atcgcttca ctgccttttg actgcagagg agctaagagc ccagactgcc 1260  
agcgatgctg gcgtgggagt cagatcactt cctgcggatt ttagataccc taacttagac 1320  
ttcgggtgga aaaaatctat tgacagcaaa tctttcatct caatttctaa ctctcttca 1380  
gctgaaaatg ataattactg taagcacagc acaattgtcc ctgaaaatgc tgcacatcaa 1440  
ggtgctaata gaacctctc tctagaaaat catgacaaa tgtctgtgaa ctgcagaacg 1500  
ttgctcagcg agtcccctgg taagctccac gttgaagttt cagcagatct tacagcaatt 1560  
aatggtcttt cttaaatca aaatctcgcc aatggcagtt atgatttagc taacagagac 1620  
ttttgccaag gaaatcagct aaattactac aagcaggaaa taccgtgca accaactacc 1680  
tcatattcca ttcagaattt atacagttac gagaaccagc cccagcccag cgatgaatgt 1740  
actctctga gtaataaata ccttgatgga aatgctaaca aatctacctc agatggaagt 1800  
cctgtgatgg ccgtaatgcc tggtagaca gacactattc aagtgtcaa gggcaggatg 1860  
gattctgagc agagcccttc tattgggtac tcctcaagga ctcttggccc caatcctgga 1920

cttattcttc aggctttgac.tctgtcaaac gctagtgatg gatttaacct ggagcggctt 1980  
gaaatgcttg gcgactcctt tttaaagcat gccatcacca catatctatt ttgcacttac 2040  
cctgatgcgc atgagggccg cctttcatat atgagaagca aaaaggctcag caactgtaat 2100  
ctgtatcgcc ttggaaaaaa gaagggacta cccagccgca tgggtggtgtc aatatttgat 2160  
ccccctgtga attggcttcc tcctggttat gtagtaaadc aagacaaaag caacacagat 2220  
aaatgggaaa aagatgaaat gacaaaagac tgcatgctgg cgaatggcaa actggatgag 2280  
gattacgagg aggaggatga ggaggaggag agcctgatgt ggagggtcc gaaggaagag 2340  
gctgactatg aagatgattt cctggagtat gatcaggaac atatcagatt tatagataat 2400  
atgttaatgg ggtcaggagc ttttgtaaag aaaatctctc tttctccttt ttcaaccact 2460  
gattctgcat atgaatggaa aatgccc aaaatcctcct taggtagtat gccattttca 2520  
tcagattttg aggattttga ctacagctct tgggatgcaa tgtgctatct ggatcctagc 2580  
aaagctgttg aagaagatga ctttgtggtg gggttctgga atccatcaga agaaaactgt 2640  
ggtgttgaca cgggaaagca gtccatttct tacgacttgc aactgagca gtgtattgct 2700  
gacaaaagca tagcggactg tgtggaagcc ctgctgggct gctatttaac cagctgtggg 2760  
gagagggtg ctacagctttt cctctgttca ctggggctga aggtgctccc ggtaattaaa 2820  
aggactgatc gggaaaaggc cctgtgccct actcgggaga atttcaacag ccaacaaaag 2880  
aacctttcag tgagctgtgc tgctgcttct gtggccagtt cacgctcttc tgtattgaaa 2940  
gactcggaa atggttgttt gaagattcca ccaagatgta tgtttgatca tccagatgca 3000  
gataaaacac tgaatcacct tatatcgggg tttgaaaatt ttgaaaagaa aatcaactac 3060  
agattcaaga ataaggctta ccttctccag gcttttacac atgcctccta cactacaat 3120  
actatcactg attgttacca gcgcttagaa ttcctgggag atgcgatttt ggactacctc 3180  
ataaccaagc accittatga agaccgcgg cagcactccc cgggggtcct gacagacctg 3240  
cggctctgcc tggtaacaaa caccatcttt gcatcgctgg ctgtaaagta cgactaccac 3300  
aagtacttca aagctgtctc tcctgagctc ttccatgtca ttgatgactt tgtgcagttt 3360  
cagcttgaga agaatgaaat gcaaggaatg gattctgagc ttaggagatc tgaggaggat 3420

gaagagaaag aagaggatat tgaagttcca aaggccatgg gggatatattt tgagtcgctt 3480  
gctggtgcca tttacatgga tagtgggatg tctactggaga cagtctggca ggtgtactat 3540  
cccatgatgc ggccactaat agaaaagttt tctgcaaagt taccctgttc ccctgtgcga 3600  
gaattgcttg aaatggaacc agaaactgcc aaatttagcc cggctgagag aacttacgac 3660  
gggaagggtca gagtcactgt ggaagtagta ggaaagggga aatttaaagg tgttggtcga 3720  
agttacagga ttgccaaatc tgcagcagca agaagagccc tccgaagcct caaagcta 3780  
caacctcagg ttcccaatag ctaa 3804

<210> 20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer rsGFP-F to amplify a gene encoding rsGFP

<400> 20

gccacaacat tgaagatgga

20

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer rsGFP-R to amplify a gene encoding rsGFP

<400> 21

gaaagggcag attgtgtgga

20

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer Neo-F to amplify a gene encoding Neo

<400> 22

atagcgttgg ctaccctga

20

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer Neo-R to amplify a gene encoding Neo

<400> 23

gaaggcgata gaaggcgatg

20

<210> 24  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer dsl-1 to amplify a gene encoding luciferase

<400> 24

gggtaatacg actcactata gggagaatgg aagacgccaa aa

42

<210> 25  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer dsl-2 to amplify a gene encoding luciferase

<400> 25

gggtaatacg actcactata gggagagaac gtgtacatcg ac

42

## 【書類名】 要約書

## 【要約】

## 【課題】

特定の長さの dsRNA を生成させる活性を有する、dsRNA 分解活性を有するタンパク質の提供、RNA 干渉等を利用可能な特定の長さの dsRNA を効率よく生成させる方法並びに RNA 合成の促進方法を提供すること。

## 【解決手段】

長鎖の dsRNA に作用して特定の長さの dsRNA を生成させる活性を有する、dsRNA 分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質、例えば RNA 結合活性を有するタンパク質の共存下で dsRNA に dsRNA 分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さの dsRNA を効率よく調製できる方法及び当該核酸結合活性を有するタンパク質が dsRNA 合成に代表される RNA 合成反応においてもその効率を向上させる方法。

【選択図】           なし

特願 2 0 0 3 - 4 0 9 6 3 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 2 0 1 9 2 4 5 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 4 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号

氏 名

タカラバイオ株式会社